



Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines régulatrices des réseaux périnucléaires d'actine, les Refilines. Interaction avec la Filamine A et implication dans le remodelage du noyau cellulaire

Olivia Gay

► To cite this version:

Olivia Gay. Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines régulatrices des réseaux périnucléaires d'actine, les Refilines. Interaction avec la Filamine A et implication dans le remodelage du noyau cellulaire. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV033 . tel-00631139

HAL Id: tel-00631139

<https://theses.hal.science/tel-00631139>

Submitted on 11 Oct 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
Spécialité : Biologie Cellulaire
Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par
Olivia GAY

Thèse dirigée par **Jacques BAUDIER**

**préparée au sein du Laboratoire Biologie à Grande Echelle, Equipe
Biopuces et Génomique Fonctionnelle**

dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant.

Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines régulatrices des réseaux périnucléaires d'actine, les Refilines.

Interaction avec la Filamine A et implication dans le remodelage du noyau cellulaire.

Thèse soutenue publiquement le 19 septembre 2011,
devant le jury composé de :

M. Rémy SADOUL
Pr, Grenoble, Président

M. Matthieu PIEL
CR, Paris, Rapporteur

M. Ali BADACHE
CR, Marseille, Rapporteur

Mme. Nathalie SPASSKY
CR, Paris, Membre

M. Edgar GOMES
CR, Paris, Membre

M. Jacques BAUDIER
CR, Grenoble, Membre



REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au CEA de Grenoble dans l'équipe «Biomics» dirigée par Xavier Gidrol dans le laboratoire Biologie à Grande Echelle. Je tiens à remercier Rémy Sadoul d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. J'exprime également toute ma gratitude et ma reconnaissance à Ali Badache, Matthieu Piel, Nathalie Spassky et Edgar Gomes qui ont accepté de faire partie de ce jury et de consacrer du temps afin d'examiner, juger et d'améliorer ce mémoire de thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes suivantes :

Tout d'abord merci à Jacques Baudier de m'avoir accueilli dans le laboratoire « Transduction du Signal » pour mon master 2, puis pour la thèse qui a suivie et d'avoir encadré mon travail au cours de ces 4 années. Un sincère merci pour la confiance et liberté que tu m'a accordées et pour ta disponibilité et ton envie de rester connecté à ce qui se passe à la paillasse (il le faut pour savoir faire un « beau blot »). J'ai vraiment apprécié ton optimisme, qui s'est notamment avéré nécessaire lorsque les résultats devenaient confus voire incompréhensibles !

Je tiens également à dire un grand merci à Benoit Gilquin qui m'a apporté énormément tant par ses connaissances théoriques et ses « bonnes pratiques de laboratoire » que par son énergie et sa curiosité. Merci pour ta disponibilité même si c'était parfois un réel défi de te suivre en courant dans les couloirs du C3...

Merci aussi à Christelle Benaud pour ta gentillesse et pour m'avoir éclairée de tes connaissances, notamment sur le cytosquelette.

Nicole, bravo pour tout ce que tu as fait « dans l'ombre » pour simplifier le travail de tous au labo, pour ta disponibilité et pour avoir su répondre à toutes mes interrogations sur les manips, la sécurité au labo et sur tellement d'autres sujets.

Nicolas Merle, ce n'était finalement pas si mal d'avoir partagé, sans transition jamais, tes « geek facts » et toutes ces (longues) histoires sur les mitochondries et les associations. En tout cas, ta motivation et ta gentillesse ont fait de toi un co-thésard très appréciable pendant ces 3 années de vie commune.

Sonia Lidy et Nicole Lefebvre au secrétariat du C3, merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre efficacité légendaire!! Merci également à Patricia Lecluyse qui a tout autant assuré à Biomics.

A l'équipe des drosophilistes, dite « les mouches », Dom, Anne-Claire, Perrine, Elodie et puis les autres aussi : merci pour les astuces de biomol' et de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des drosos. Un petit clin d'œil aussi aux moments de détente agrémentés de 'ti punch qui ont contribué, même si on s'est parfois éloignés de la science, à créer des échanges de qualité.

Aux membres de cette nouvelles équipe pluridisciplinaire Biomics : travailler avec vous m'a apporté des visions complémentaires et a été une véritable bouffée d'air frais sur le plan scientifique. J'ai beaucoup apprécié ces 5 mois à vos cotés (merci l'open-space et la proximité de mon bureau au coin café !!), merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre bonne humeur.

Evidemment un big up à Sophie et Alex, qui ont animé les repas au H2 et les pauses thé de la salle de convivialité pendant ces quelques années. Alex, pour ton humour, ta passion pour la Science et parce que j'ai toujours pu compter sur toi. Sophie, mon amie potiche du CAS qui pratique la passation de micro comme personne dans l'amphi Dautreppe, merci pour ces franches rigolades !

A ma famille et mes copines, qui ont montré beaucoup de curiosité pour ce je faisais (même si ca ne leur parlait pas toujours), merci d'avoir eu la patience d'écouter mes interminables histoires de labo !

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	1
---------------------------	----------

INTRODUCTION	3
---------------------------	----------

A. LE CYTOSQUELETTE CELLULAIRE	3
---	----------

A.1 LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE	5
--	----------

A.1.1 GENERALITES	5
-------------------------	---

A.1.2 REGULATIONS	6
-------------------------	---

A.1.2.1 Les protéines modulant la dynamique des filaments d'actine.	7
--	---

A.1.2.2 Les types de superstructures d'actine	8
---	---

A.1.2.3 Les protéines de stabilisation et de réticulation de l'actine.	9
---	---

A.1.3 UN EXEMPLE DE FONCTION DES ORGANISATIONS D'ACTINE : LA MIGRATION.	10
--	----

A.2 STRUCTURES PROTRUSIVES LARGES : LES LAMELLIPODES	12
---	-----------

A.3 STRUCTURES EN CABLES.....	13
--------------------------------------	-----------

A.3.1 LES FILOPODES	14
---------------------------	----

A.3.2 LES FIBRES DE STRESS.....	14
---------------------------------	----

A.3.3 LES DIVERS TYPES DE FIBRES DE STRESS	15
--	----

A.3.3.1 Les fibres de stress dorsales.....	16
--	----

A.3.3.2 Les arcs transverses	17
------------------------------------	----

A.3.3.3 Les fibres de stress ventrales	18
--	----

A.3.4 LES FIBRES DE RETRACTION	18
--------------------------------------	----

A.4 NOUVELLES STRUCTURES D'ACTINE PERINUCLEAIRES: LA COIFFE D'ACTINE ET LES CABLES D'ACTINE ANCRES A LA LIGNE TAN	18
--	-----------

A.4.1 FONCTIONS DE LA COIFFE D'ACTINE ET DE LA LIGNE TAN	19
--	----

A.4.1.1 La coiffe d'actine et la régulation de la forme nucléaire	19
---	----

A.4.1.2 La ligne TAN et le mouvement nucléaire lors de la polarisation	21
--	----

A.4.2 LES COMPLEXES LINC : LIEN ENTRE LES STRUCTURES D'ACTINE PERINUCLEAIRES ET L'ENVELOPPE NUCLEAIRE .	22
---	----

A.4.2.1 Composition et variétés des complexes LINC et leur liaison aux cytosquelettes	23
---	----

A.4.2.2 Les Lamines	24
---------------------------	----

A.4.2.3	Les Nesprines	25
A.4.2.4	Les protéines SUN de la membrane interne	26

B. LES FILAMINES ET REFILINES, PROTEINES ORGANISATRICES DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE ... 27

B.1 LA FAMILLE DES FILAMINES..... 27

B.1.1	LES PROTEINES DE LA FAMILLE FILAMINE : DIFFERENCES D'EXPRESSION, DE LOCALISATION ET EXISTENCE DE VARIANTS	28
B.1.2	STRUCTURE DE LA FILAMINEA	28
B.1.2.1	Le domaine de liaison à l'actine de la FilamineA	29
B.1.2.2	Structure des domaines de type-immunoglobuline.	30
B.1.2.3	Dimérisation de la FilamineA	31
B.1.3	PARAMETRES DE LA FILAMINEA MODULANT L'ORGANISATION D'ACTINE.	31
B.1.3.1	Le rapport concentration FilamineA/actine.....	32
B.1.3.2	Variants de la Filamine et leurs diverses propriétés.....	32
B.1.4	LES INTERACTIONS DE LA FILAMINEA AVEC SES LIGANDS	32
B.1.4.1	Vue générale	32
B.1.4.2	Les spécificités d'interaction des différentes Filamines.....	33
B.1.4.3	L'oligomérisation et regroupement des partenaires de la FilamineA	34
B.1.4.4	Autoinhibition des domaines par leur structure en paire avec leur voisins	35
B.1.4.5	Compétitions d'interaction sur les domaines, exemple de l'activation des Intégrines sur le domaine 21.....	37
B.1.4.6	Conclusion sur les interactions de la FilamineA.....	38
B.1.5	LES FONCTIONS DE LA FILAMINEA.....	39
B.1.5.1	Approche fonctionnelle par l'analyse des syndromes liés à des mutations génétiques de la FilamineA chez l'Homme.....	39
B.1.5.2	Approche fonctionnelle par l'analyse de modèles murins invalidés pour la FilamineA	41
B.1.6	LE ROLE CONTRADICTOIRE DE LA FILAMINEA DANS LA MIGRATION	43
B.1.6.1	La FilamineA favorise la migration	43
B.1.6.2	La FilamineA inhibe la migration.....	43
B.1.7	LA FILAMINEA ET LES JONCTIONS CELLULAIRES	44
B.2	LES REFILINES.....	45
B.2.1	LES GENES DE LA FAMILLE <i>FAM101</i> CODENT POUR LES REFILINES.....	45
B.2.2	ETUDE DES SEQUENCES ET CONSERVATION DES REFILINES	46
B.2.3	EXPRESSION DES REFILINES.....	46

B.2.3.1	Expression dans les bases de données.....	46
B.2.3.2	Expression par hybridation in situ dans l'étude de Hirano et al.	47
B.2.4	ETUDE <i>IN SILICO</i> DE LA SEQUENCE PROTEIQUE POUR L'IDENTIFICATION DE DOMAINES DE REGULATION POTENTIELS.....	47
B.2.4.1	Sites potentiels de phosphorylation	47
B.2.4.2	Autre site reconnu : la boîte TonB	47
B.2.4.3	Sites potentiels de dégradation des Refilines	48
B.2.4.3.1	<i>La séquence PEST</i>	48
B.2.4.3.2	<i>Les motifs DSG(X)_{2+n}S : un signal de dégradation par le protéasome</i>	49

C. LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE 52

C.1.1	DEFINITION DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	52
C.1.2	MODIFICATIONS DU CYTOSQUELETTE LORS DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE	53
C.1.2.1	Positionnement du noyau dans les cellules épithéliales par le complexe LINC.....	55
C.1.2.2	L'induction de la TEM par le TGF- β dans les cellules épithéliales NmuMGs.....	56
C.1.2.3	La signalisation TGF- β dans la TEM	57
C.1.2.4	Formation de fibres de stress et modification des adhésions par le TGF- β	57
C.1.2.5	La signalisation TGF- β et l'implication des petites GTPases	58

RESULTATS..... 60

D. LA REFININEB ET LA FILAMINEA ORGANISENT UN RESEAU D'ACTINE PERINUCLEAIRE ET REGULENT LA FORME DU NOYAU 61

D.1	RESUME DE L'ARTICLE	61
D.2	INTRODUCTION	62
D.3	PUBLICATION "REFINEB (FAM101B) TARGETS FILAMINA TO ORGANIZE PERINUCLEAR ACTIN NETWORKS AND REGULATES NUCLEAR SHAPE"	63
D.4	RESULTATS SUPPLEMENTAIRES DE LA PUBLICATION.....	75
D.5	RESULTAT COMPLEMENTAIRE : REFININEA INTERAGIT AVEC LES DIMERES DE FILAMINEA	89
D.6	CONCLUSIONS.....	90

E. REGULATION ET FONCTION DU COMPLEXE REFININE/FILAMINEA DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES NEURALES MULTIPOTENTES..... 91

E.1	INTRODUCTION.....	91
E.1.1	ORIGINE COMMUNE DES NEURONES ET CELLULES GLIALES.....	91
E.1.1.1	Apparition des cellules du système nerveux central lors du développement embryonnaire	91
E.1.1.2	Les cellules souches neurales embryonnaires : Les cellules neuroépithéliales	92
E.1.1.3	Les cellules souches neurales adultes	94
E.1.2	IMPLICATION DE LA FILAMINE DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES	96
E.2	RESULTATS	97
E.2.1	IDENTIFICATION DU GENE FAM101A LORS DE LA TRANSITION DES PROGENITEURS MULTIPOTENTS EN PROGENITEURS GLIAUX	97
E.2.2	REGULATIONS DIFFERENTES ENTRE REFILENEA ET REFILENEB	98
E.2.2.1	Les Refilines sont stabilisées en conditions de confluence	99
E.2.2.2	Les séquences PEST et DSG(X) _{2+n} S modifient la demi-vie des Refilines	100
E.2.2.3	Le motif DSG(X) _{2+n} S de la RefilineB permet l'interaction avec β-Trcp.....	102
E.2.3	LE COMPLEXE REFILENE/FILAMINE EST LOCALISE SUR UNE COIFFE TRANSITOIRE D'ACTINE DANS LES PRECURSEURS NEURONAUX LORS DE LEUR DIFFERENCIATION EN CULTURE	104
E.2.3.1	La coiffe d'actine composée du complexe RefilineB/FilamineA dans les précurseurs	104
E.2.3.2	La coiffe d'actine des précurseurs neuraux est transitoire	105
E.3	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	107
E.4	MATERIEL ET METHODES	109
E.4.1	CULTURE DE LIGNEES CELLULAIRES	109
E.4.2	CULTURE DE CELLULES PROGENITRICES NEURALES DE RAT	109
E.4.2.1	Obtention de culture de CPMs de rat à long terme	109
E.4.2.2	Prolifération des cultures de CPMs à long terme en conditions d'adhésion ou en neurosphères.....	109
E.4.2.3	Différenciation des cultures de CPMs à long terme.....	110
E.4.3	INFECTION DES CPM ET U373 PAR ADENOVIRUS	111
E.4.4	INFECTION DES CELLULES U373 MG PAR LENTIVIRUS ET LIGNEE STABLE	111
E.4.5	IMMUNOFLUORESCENCE	111
E.4.6	IMMUNOPRECIPITATION	111
E.4.7	EXPERIENCES DE STABILITE DES REFILENES.....	112
<u>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</u>		113
F.	<u>LE COMPLEXE REFILENE/FILAMINE REORGANISE L'ACTINE ET GENERE DES COIFFES.....</u>	113

G.	<u>LA REGULATION COMPLEXE DE LA PROTEINE REFILINE</u>	<u>114</u>
H.	<u>ROLE FONCTIONNEL POTENTIEL DU COMPLEXE REFILINE/FILAMINE DANS L'ETABLISSEMENT DES COIFFES LORS DES PHENOMENES DE TRANSITION</u>	<u>115</u>
H.1	LORS DE L'ETAPE D'INITIATION DE MIGRATION : LA POLARISATION	115
H.2	LORS DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	116
H.3	LORS DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES NEURALES	117
	<u>TABLEAUX ANNEXES.....</u>	<u>120</u>
	<u>REFERENCES.....</u>	<u>126</u>

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: SCHEMA DES DIFFERENTES ORGANISATIONS ET LOCALISATIONS DES CYTOSQUELETES DANS LES KERATOCYTES EN MIGRATION, LES CELLULES EPITHELIALES ET LES NEURONES.	3
FIGURE 2 : PROCESSUS DE POLYMERISATION ET DYNAMIQUE DU FILAMENT D'ACTINE.....	6
FIGURE 3: ENSEMBLE DES PROTEINES INTERAGISSANT AVEC L'ACTINE.	7
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES ORGANISATIONS D'ACTINE DANS LA CELLULE ET LES PROTEINES ORGANISATRICES.	9
FIGURE 5 : SCHEMA DE L'ORGANISATION DES PROTEINES DE RETICULATION DES FILAMENTS D'ACTINE.	10
FIGURE 6 : SCHEMA DU MECANISME DE MIGRATION CELLULAIRE.	12
FIGURE 7: LES DIFFERENTES ORGANISATIONS « NON-CONVENTIONNELLES » D'ACTINE DANS LA CELLULE EN MIGRATION.	16
FIGURE 8 : LES STRUCTURES D'ACTINE PERINUCLEAIRES, COIFFE D'ACTINE ET LIGNE TAN.....	19
FIGURE 9: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ARCHITECTURE D'ACTINE AU NIVEAU BASALE ET APICAL D'UNE CELLULE ADHERENTE.	20
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA COOPERATION ENTRE LES STRUCTURES PERINUCLEAIRES D'ACTINE ET LA MYOSINE II NON-MUSCULAIRE POUR LES MOUVEMENTS NUCLEAIRES AU COURS DE LA MIGRATION DE FIBROBLASTES.	22
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENVELOPPE NUCLEAIRE ET DES CONSTITUANTS DU COMPLEXE LINC.....	23
FIGURE 12: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DE LA FILAMINEA ET DE SES DOMAINES.	29
FIGURE 13 : ORGANISATIONS DES DIMERES DE FILAMINEA CHEZ <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i> ET CHEZ L'HUMAIN.	30
FIGURE 14: SCHEMA DE LA FILAMINEA ET DE SES INTERACTANTS.....	33
FIGURE 15 : DIAGRAMMES EN RUBAN DU COMPLEXE COMPOSE DE 2 MOLECULES DU DOMAINE 21 DE LA FILAMINEA AVEC L'INTEGRINE B7 OU AVEC LA MIGFILINE.	34
FIGURE 16: SCHEMA DU REGROUPEMENT DES LIGANDS PAR LA FILAMINEA, EXEMPLE DES INTEGRINES.	35
FIGURE 17: ORGANISATION ET STRUCTURE DES DOMAINES 19-21. DIAGRAMME EN RUBAN OBTENU A PARTIR DES CRISTAUX DES DOMAINES 19-21.....	36
FIGURE 18: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ACTIVATION DES INTEGRINES ET DE LA REGULATION PAR LA FILAMINEA.....	38
FIGURE 19: ALIGNEMENT DE SEQUENCE DES PROTEINES REFILENA ET REFILENB DE RAT.	46
FIGURE 20: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PROTEINES REFILENA ET REFILENB DE RAT.	48
FIGURE 21: LES ETAPES DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	53
FIGURE 22: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE DANS LES CELLULES EPITHELIALES POLARISEES.	54
FIGURE 23: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION ET DU ROLE DE LA MYOSINE DANS LES CELLULES EPITHELIALES.	56
FIGURE 24 : REFILENA SE LIE A LA FOIS AVEC LA FILAMINEA ENDOGENE ET UN MUTANT DE FILAMINEA DEPOURVU DU DOMAINE DE DIMERISATION.	89
FIGURE 25: APPARITION DES TROIS TYPES CELLULAIRES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL AU COURS DU DEVELOPPEMENT CHEZ LE RAT.	92
FIGURE 26: ORIGINE DES CELLULES DU SNC LORS DU DEVELOPPEMENT.	94
FIGURE 27: NEUROGENESE DANS LES CERVEAUX MAMMIFERES ADULTES.....	95

FIGURE 28: IDENTIFICATION DU GENE FAM101A CODANT POUR LA REFILINEA EXPRIME LORS DE L'ENGAGEMENT DE PROGENITEURS MULTIPOTENTS EN CPOS.	98
FIGURE 29: REGULATIONS DES ARN MESSAGERS ET PROTEINES DE REFILINEA ET REFILINEB DANS LES CELLULES PROGENITRICES NEURALES.	99
FIGURE 30: LA QUANTITE DE REFILINEA ET REFILINEB DEPEND DE LA CONFLUENCE CELLULAIRE.	100
FIGURE 31 : CARACTERISATION DES PROTEINES REFILINE.	101
FIGURE 32: REGULATIONS DES DUREES DE VIE DE REFILINEA ET REFILINEB.	102
FIGURE 33 : LES SERINES DU MOTIF DSG(X) _{2+N} S DE REFILINEB SONT NECESSAIRES POUR SA LIAISON AVEC B-TRCP1.	103
FIGURE 34: LES CELLULES PROGENITRICES NEURALES POSSEDENT DES COIFFES D'ACTINE, DE FILAMINEA ET DE REFILINEB.	105
FIGURE 35: LES CELLULES PROGENITRICES NEURALES POSSEDENT DES COIFFES D'ACTINE TRANSITOIRES.	106
FIGURE 36: CULTURE DE CELLULES PROGENITRICES GLIALES DE RAT EN NEUROSOPHERES OU EN CONDITIONS D'ADHESION.	110
FIGURE 37: LE COMPLEXE REFILINE/FILAMINE ORGANISE LES RESEAUX D'ACTINE EN FIBRES PARALLELES POUR FORMER LES COIFFES D'ACTINE.	114
FIGURE 38: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MOUVEMENTS NUCLEAIRES LORS DE LA POLARISATION DES FIBROBLASTES 3T3... ..	116
FIGURE 39 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MOUVEMENTS NUCLEAIRES DANS LES PRECURSEURS NEURONAUX.	118
FIGURE 40: SCHEMA DE LA MIGRATION NUCLEAIRE INTERCINETIQUE DANS LES PRECURSEURS NEURONAUX.	119

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : RECAPITULATIF DES 3 CYTOSQUELETES CELLULAIRES, LEURS SOUS-UNITES, PROPRIETES, LOCALISATIONS ET FONCTIONS. .	4
TABLEAU II : PROTEINES DE RETICULATION DES FILAMENTS D'ACTINE.	9
TABLEAU III : DIFFERENCES ENTRE LE LAMELLIPODE ET LE LAMELLUM.	13
TABLEAU IV: LES DIFFERENTES ORGANISATIONS D'ACTINE EN FIBRES.....	16
TABLEAU V: RESUME DES COMPLEXES LINC POSSIBLES ET LEURS COMPOSANTS.....	23
TABLEAU VI: LOCALISATION DES GENES DE LA FILAMINEA, FILAMINEB ET FILAMINEC CHEZ L'HUMAIN ET LA SOURIS.	27
TABLEAU VII: RECAPITULATIF DES SYNDROMES LIES A DES MUTATIONS SUR LE GENE DE LA FILAMINA ET LEURS IMPACTS SUR LE DEVELOPPEMENT.....	41
TABLEAU VIII: LES GENES FAM101A ET FAM101B CHEZ L'HUMAIN, LE RAT ET LA SOURIS.	45
TABLEAU IX: RECAPITULATIF DES MOTIFS DE TRANSCRIPTION GENES FAM101A ET FAM101B ET D'EXPRESSION DES PROTEINES REFILINEA ET REFILENEB CHEZ L'HUMAIN ET LA SOURIS A PARTIR DE BASES DE DONNEES.	46
TABLEAU X: LES SCORES PEST DES REFILENEA ET B CHEZ L'HOMME ET LE RAT.	48
TABLEAU XI: LES PROTEINES PRESENTANT DES SEQUENCES DSG(X)2+NS.	50
TABLEAU XII: DIFFERENCES D'ORGANISATION D'ACTINE ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES ET LES CELLULES MESENCHYMATEUSES. ...	55
TABLEAU XIII : PROTEINES SE LIANT A L'ACTINE.....	120
TABLEAU XIV: PROTEINES SE LIANT AUX FILAMINES.	122

LISTE DES ABREVIATIONS

ABD	Actin Binding Domain
actine F	actine Filamenteuse
actine G	actine Globulaire
ALDH1L1	ALdehyde DeHydrogenase 1 family, member L1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ASB2	Ankyrin repeat containing protein
ATF4	Activator Transcription Factor 4
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CPM	Cellules Progénitrices Multipotentes
CPO	Cellules Progénitrices Oligodendrogiales
EGF	Epidermal Growth Factor
FAK	Focal Adhesion Kinase
FLNA	FilamineA
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GSK3- β	Glycogen Synthase Kinase 3- β
I- κ B	Inhibitor of NF-kappaB
LINC	LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
MAPK	Mitogen-Activated Protein kinases
MBP	Myelin Basic Protein
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MTOC	MicroTubule-Organizing Center
NF- κ B	Nuclear Factor-kappaB
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR- α	Platelet-Derived Growth Factor Receptor-alpha
PLP	Proteolipid Protein
ROCK	Rho Kinase
SNC	Système Nerveux Central
SVZ	SubVentricular Zone
TAN	Transmembrane Actin-associated Nuclear
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta

Avant-propos

L'équipe du Dr. Jacques Baudier s'intéresse aux protéines de la signalisation calcium dans les contrôles de la différenciation des cellules progénitrices neurales, dans les conditions physiologiques et pathologiques des gliomes. Ces travaux ont conduit à l'identification de protéines qui interagissent avec le cytosquelette d'actine (IQGAP1, AHNAK) et qui participent à l'homéostasie des cellules souches et progénitrices neurales.

Lors de mon arrivée dans l'équipe en Master 2, le Dr Benoit Gilquin venait d'identifier une nouvelle famille de protéines référencée par les sigles FAM101A-B/cfm2-1 dans les banques de données, et dont l'ARNm de l'isoforme FAM101A était spécifiquement induit au cours de la transition des cellules progénitrices neurales multipotentes en cellules progénitrices gliales. Des premières observations sur la localisation de la protéine de fusion FAM101A-GFP dans les cellules ont montré une association avec le cytosquelette d'actine. Le but de mon projet de thèse fut alors d'étudier l'interaction des protéines FAM101 avec le cytosquelette d'actine et de préciser leurs fonctions et leurs régulations lors de transitions cellulaires.

J'ai dans un premier temps montré que ces protéines agissent comme des interrupteurs moléculaires pour réorganiser les filaments d'actine en câble d'actine en se complexant à la protéine de liaison à l'actine, la FilamineA. Nous avons donc nommé cette nouvelle famille de protéine « Refiline », pour Regulator of Filamine. J'ai ensuite mis en évidence que les câbles d'actine induits par le complexe Refiline/FilamineA participent à l'organisation d'une nouvelle structure d'actine périnucléaire appelée « coiffe d'actine » dans les fibroblastes. J'ai finalement montré que les protéines Refilines étaient capables de façon plus générale de participer à l'organisation de réseaux périnucléaires d'actine au cours de la transition épithéliale mésenchymateuse induite par le TGF- β et dans les cellules progénitrices neurales induites à se différencier en cellules progénitrices gliales. Au final ces résultats ouvrent aussi de nouvelles perspectives pour comprendre la biologie et les fonctions des réseaux périnucléaires d'actine dans les mécanismes de mécanotransduction ciblés vers le noyau dans le cadre de programme de différenciation.

Ce manuscrit s'articule en cinq grandes parties. Dans la première, je décrirai le cytosquelette d'actine en général, en me focalisant sur les différents types d'organisation cellulaire des filaments d'actine et les protéines de régulation. J'inclurai dans ce chapitre une partie concernant les nouvelles

structures périnucléaires d'actine appelées coiffe d'actine et ligne TAN (transmembrane actin-associated nuclear line). J'en profiterai également pour traiter des récentes données concernant les systèmes d'interaction des réseaux d'actine périnucléaire avec la membrane nucléaire.

Dans la deuxième partie je présenterai les acteurs de mes travaux : les protéines FilamineA et Refilines. Ce chapitre me permettra de présenter les rôles des protéines Filamines et les syndromes associés aux mutations du gène *FilamineA* chez l'Homme, et de poser la question de sa fonction qui est encore mal définie.

La troisième partie constituera une introduction sur la transition épithélio-mésenchymateuse et les rôles du cytosquelette d'actine dans ce processus cellulaire puisque c'est le contexte d'étude choisi pour ma publication.

Ensuite, dans la quatrième partie sera présenté le premier volet de mes travaux, portant sur les caractérisations moléculaires et cellulaires de l'interaction des Refilines avec la FilamineA et l'implication du complexe Refiline/Filamine dans l'organisation des structures périnucléaires d'actine dans les fibroblastes et au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Enfin, la dernière partie me permettra d'exposer mes données récentes concernant les caractéristiques des protéines Refilines, notamment la régulation de leur courte demi-vie, et les fonctions envisagées pour les protéines Refilines au cours des phases précoces de la différenciation des cellules progénitrices neurales.

INTRODUCTION

Introduction

A. Le cytosquelette cellulaire

Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments protéiques s'étendant dans l'ensemble du cytoplasme et responsable de fonctions diverses. Il organise le contenu de la cellule et permet le transport des cargos cellulaires. Il relie physiquement et biochimiquement la cellule à son environnement et génère des forces coordonnées nécessaires au maintien ou changement de forme, à la résistance à la déformation et à la motilité cellulaire (Alberts, Wilson et al. 2008; Fletcher and Mullins 2010). Chez les mammifères, le cytosquelette est un système dynamique et adaptable constitué de 3 types de filaments auxquels on attribue des fonctions distinctes. Les filaments intermédiaires procurent la force mécanique, les microtubules localisent les organelles et sont responsables du transport intracellulaire et les filaments d'actine (ou microfilaments) déterminent la forme cellulaire et permettent la locomotion (Alberts, Wilson et al. 2008).

Selon les types cellulaires, les organisations des cytosquelettes peuvent grandement varier (Figure 1).

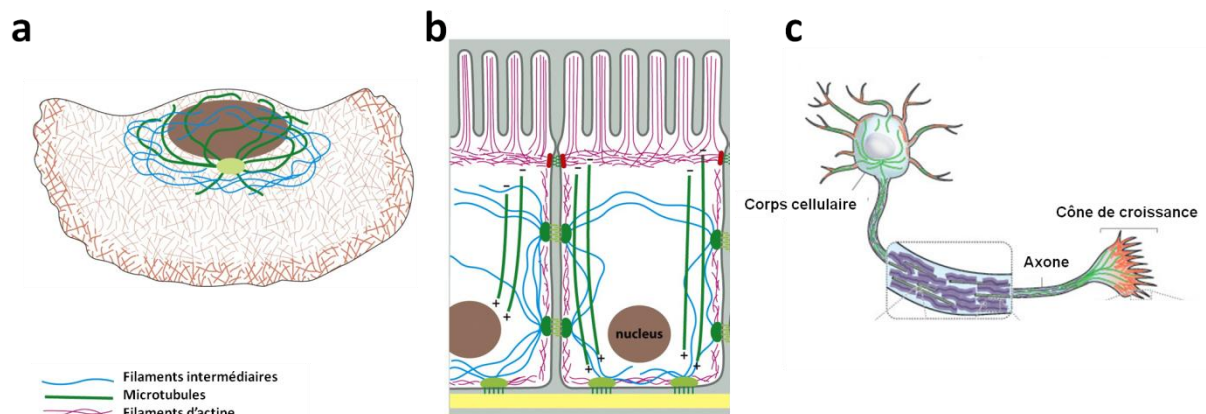


Figure 1: Schéma des différentes organisations et localisations des cytosquelettes dans les kératocytes en migration, les cellules épithéliales et les neurones.

La distribution des filaments du cytosquelette varie selon le type cellulaire.

a : Dans les kératocytes, les filaments d'actine (rouge) se trouvent dans le lamellipode, les microtubules (vert) et filaments intermédiaires (bleu) restreints autour du noyau.

b : Dans les cellules épithéliales, l'actine est en réseau sous-jacent à la membrane plasmique ou en filaments au niveau cortical, les microtubules sont orientés verticalement de façon apico-basale et les filaments intermédiaires se situent à travers le cytoplasme et se lient aux complexes jonctionnels.

c : Dans les neurones, on retrouve l'actine au cône de croissance et les microtubules et filaments intermédiaires dans l'axone et les dendrites.

D'après (Alberts, Wilson et al. 2008; Fletcher and Mullins 2010).

Chaque type de cytosquelette présente des caractéristiques propres à sa fonction et distinctes des autres cytosquelettes (Tableau I).

	Sous-unité et organisation	Propriétés des filaments	Localisations	Fonctions
Microtubules	hétérodimères d' α/β tubuline, organisés en longs cylindres polarisés creux (longueur de 200nm à 25 μ m, diamètre de 25nm) dynamiques d'assemblage-désassemblage complexe	rigides et droits, extrémités (-) typiquement attachées à un centrosome ou MTOC (microtubule-organizing center) proche du noyau	en étoile depuis le centre de la cellule en interphase, se réarrangent pour former un fuseau mitotique lors de la division cellulaire, à l'avant du noyau lors de la migration	<ul style="list-style-type: none"> - constituent des « rails » pour le transport de vésicules ou protéines grâce à des moteurs moléculaires - responsables de la croissance axonale - génèrent des structures motiles (cils et flagelles) à la surface de la cellule
Filaments intermédiaires	Les protéines de la famille des filaments intermédiaires sont assemblées en filaments de homo- ou hétéro-oligomères (diamètre 10nm) les filaments ne sont pas polarisés	<ul style="list-style-type: none"> - filaments bien plus flexibles que microtubules et filaments d'actine - beaucoup moins rigides que les microtubules - résistants 	<ul style="list-style-type: none"> - présents dans l'ensemble du cytoplasme et dans le noyau sous l'enveloppe nucléaire (lamines) - leur localisation dépend du type cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> - procurent une force de résistance (présents dans les cellules subissant un stress mécanique) - un réseau de lamines sous l'enveloppe nucléaire des cellules eucaryotes génère une force de résistance et ancre les chromosomes et les pores nucléaires
Filaments d'actine	<ul style="list-style-type: none"> - les sous-unités forment des filaments en hélice (diamètre 5-9 nm) qui sont organisés en câbles ou réseaux en 2 ou 3 dimensions - filaments polarisés où bout barbé à croissance rapide et extrémité pointue à croissance plus lente 	structure flexible	<ul style="list-style-type: none"> - sous la membrane plasmique - constituent des projections de surfaces (lamellipodes, filopodes, microvilli) - présents dans l'ensemble de la cellule 	<ul style="list-style-type: none"> - procurent force et morphologie - indispensables à la formation de l'anneau de contraction lors de la division cellulaire - nécessaires pour la contraction par la Myosine - régulent la transcription de gènes

Tableau I : Récapitulatif des 3 cytosquelettes cellulaires, leurs sous-unités, propriétés, localisations et fonctions.

D'après (Gruenbaum, Margalit et al. 2005; Alberts, Wilson et al. 2008; Starr 2009; Zheng, Han et al. 2009; Fletcher and Mullins 2010).

Ces trois cytosquelettes ont des propriétés mécaniques, dynamiques et biologiques distinctes mais partagent certaines caractéristiques : ce sont tous des réseaux interconnectés de polymères filamenteux et de protéines régulatrices. En effet, pour leur bon fonctionnement tous ces systèmes requièrent la coopération de protéines accessoires qui lient les filaments à d'autres composants cellulaires ou aux autres filaments (Fletcher and Mullins 2010).

Plusieurs protéines des filaments intermédiaires, telles que les protéines de la famille des Plakines, sont capables de se lier aux microfilaments d'actine et aux microtubules car elles possèdent des domaines de liaison spécifiques. Elles constituent un lien entre les 3 cytosquelettes (Wiche 1998; Sonnenberg and Liem 2007). Nous verrons au chapitre « A.4. Nouvelles structures d'actine périnucléaires: la coiffe d'actine et ligne TAN » comment les interactions entre différentes protéines des cytosquelettes participent à l'organisation des interactions entre les fibres périnucléaires d'actine et la membrane nucléaire.

A.1 Le cytosquelette d'actine

A.1.1 Généralités

Le cytosquelette d'actine est impliqué dans des fonctions cellulaires aussi diverses que l'adhésion, la migration, la division, la différenciation, la polarisation ou la contraction (Winder and Ayscough 2005). L'organisation en structures d'ordre supérieur, fonctionnelles et dynamiques est cruciale pour accomplir ces activités multiples et elle dépend de protéines régulatrices spécifiques.

L'actine est présente sous deux formes dans toutes les cellules eucaryotes : l'actine globulaire (actine G), protéine d'environ 43 kDa (Figure 2a), qui peut polymériser afin de former l'actine filamenteuse (actine F) et dépolymériser selon les besoins de la cellule. Les molécules d'actine G établissent des contacts pour s'assembler en filaments double-hélice polarisés et dynamiques (Figure 2b).

Le processus de polymérisation de l'actine se déroule comme suit et est représenté dans la Figure 2. La nucléation, première étape de formation de nouveaux filaments d'actine, est une étape lente où deux molécules d'actine G interagissent d'abord par des liaisons faibles puis s'ajoute une troisième molécule stabilisant le groupe. Ce trimère, ou « noyau de polymérisation », est la structure minimale nécessaire à l'élongation d'un filament. S'ensuit l'élongation, où des monomères s'ajouteront aux extrémités ; cette étape est beaucoup plus rapide.

L'élongation se poursuit à chaque extrémité jusqu'à ce que la concentration en actine G atteigne une « concentration critique » en dessous de laquelle l'incorporation aux filaments est impossible (Alberts, Wilson et al. 2008). Les 2 extrémités des filaments d'actine présentent des concentrations minimales différentes pour l'assemblage des monomères. Lorsque le niveau de monomères se situe entre ces 2 concentrations critiques, le désassemblage à l'extrémité (-) (bout pointu) est compensé par la polymérisation à l'extrémité (+) (bout barbé). Ainsi, le filament d'actine est en équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation.

Grâce à cet équilibre dynamique (ou pseudo état stationnaire), la longueur du filament d'actine demeure constante alors que l'actine se déplace d'une extrémité à l'autre au sein du polymère: c'est le processus de « treadmilling » (tapis-roulant), schématisé dans la figure 2.

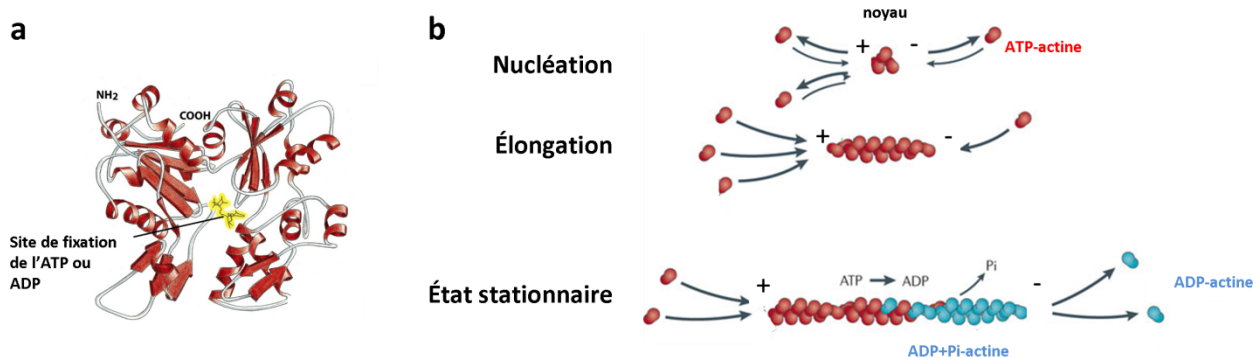


Figure 2 : Processus de polymérisation et dynamique du filament d'actine.

a : La molécule d'actine G se lie à une molécule d'ATP ou ADP pour son incorporation dans le filament.

b : Au cours de la nucléation, il y a assemblage d'un noyau de trois monomères d'actine qui formeront la structure de départ nécessaire à l'élongation d'un nouveau filament. L'état stationnaire correspond à l'équilibre dynamique du filament où des monomères sont perdus à l'extrémité (-) mais d'autres ajoutés au niveau de l'extrémité (+) selon le principe du treadmilling.

On retrouve le complexe ATP-actine au bout barbé (rouge), puis l'ADP+Pi-actine au centre du filament et l'ADP-actine au bout pointu (bleu).

D'après (Alberts, Wilson et al. 2008; Nurnberg, Kitzing et al. 2011).

Les sous unités d'actine G se lient à un complexe adénosine-nucléotide de façon non-covalente (Figure 2a). Les complexes actine G-ATP se lient préférentiellement au bout barbé des filaments d'actine et dès leur incorporation dans le filament, la molécule d'ATP est hydrolysée, libérant un phosphate inorganique (Pi) dans le milieu cellulaire. En conséquence, les filaments d'actine sont asymétriques car composés de 3 zones selon leur enrichissement en complexe nucléotide-actine : ATP-actine au bout barbé, ADP+Pi-actine (forme transitoire) ou ADP-actine qui s'accumule à l'extrémité (-) avant d'être dissociée du filament (Figure 2b).

Ainsi, l'élongation dépend de deux facteurs : la concentration critique en actine G et l'hydrolyse de l'ATP.

A.1.2 Régulations

In vitro, les monomères d'actine forment des filaments mais ne s'organisent jamais en structures d'ordre supérieur. Dans la cellule, ces filaments se présentent sous différentes formes selon leur fonction : on peut trouver des filaments courts, des réseaux denses de filaments interconnectés, ou des faisceaux de filaments parallèles. Cette diversité dans l'organisation de l'actine suppose une grande variété dans les molécules régulant sa dynamique. La cellule possède de nombreux moyens pour adapter

la quantité de filaments, les réguler et les organiser en fonction de ses besoins. La figure 3 illustre de manière non exhaustive la diversité des protéines capables de réguler la dynamique de l'actine.

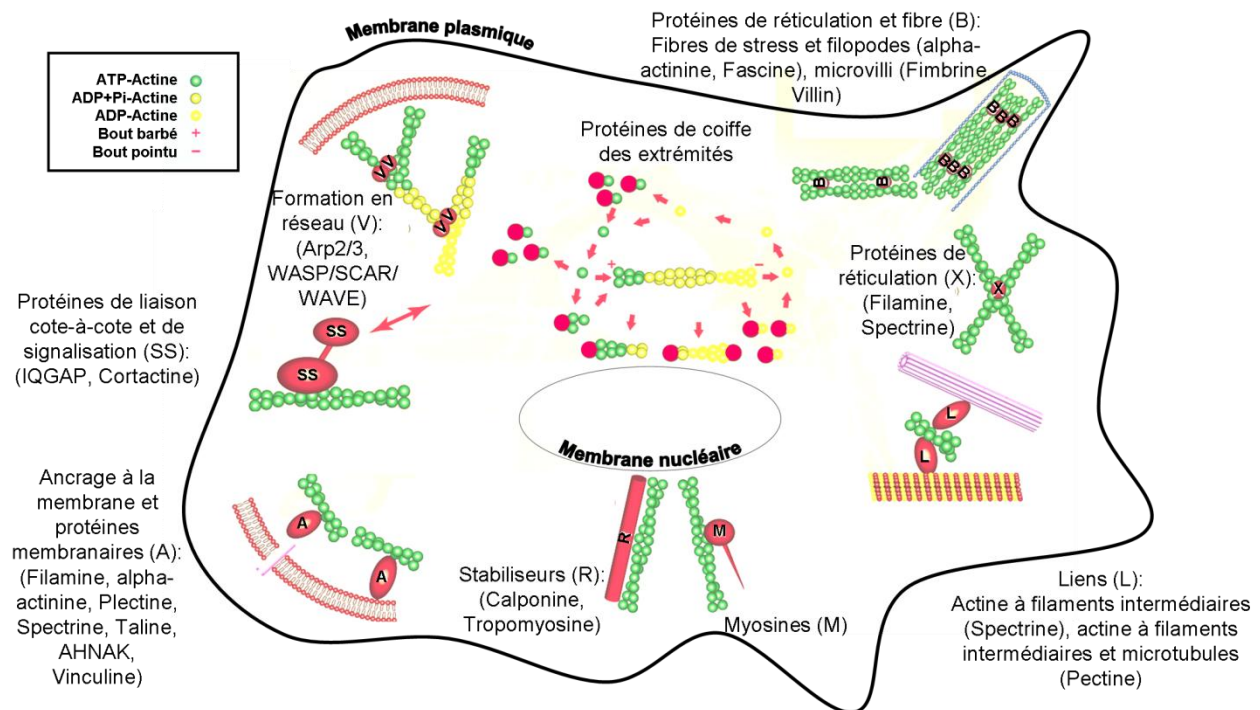


Figure 3: Ensemble des protéines interagissant avec l'actine.

Dans la cellule, l'actine s'organise grâce aux protéines de liaison à l'actine. Sur ce schéma, les protéines les plus fréquemment retrouvées sont présentées et classées selon leur fonction.

D'après (Winder and Ayscough 2005).

A.1.2.1 Les protéines modulant la dynamique des filaments d'actine.

Dès lors qu'un trimère est formé, l'élongation peut se poursuivre rapidement. Afin de contrôler les rapports des populations d'actine F et G, la cellule a mis en place différents mécanismes de régulation. La longueur, stabilité, géométrie ou le nombre de filaments d'une cellule seront régulés par un large spectre de protéines accessoires qui interagissent avec les filaments eux-mêmes ou bien avec les sous-unités libres (Fletcher and Mullins 2010). Le premier consiste en la régulation de la croissance par des protéines dites "de coiffe" qui se fixent au monomère d'actine sur l'extrémité (+) et limitent ainsi la croissance du filament ou sur l'extrémité (-) pour réduire la perte des monomères et permettre ainsi l'extension. Un autre mode de régulation est celui passant par les protéines pouvant fragmenter les filaments (« severing proteins »). Enfin, il peut y avoir la production *de novo* de filaments d'actine. Cette néo-synthèse nécessite l'intervention de protéines pouvant accélérer la nucléation des monomères et stabiliser les noyaux de polymérisation néoformés, telles le complexe Arp2/3, les Formines ou les protéines Spirs (voir Tableau XIII en annexe et se référer pour plus de détails à (Siripala and Welch 2007; Siripala and Welch 2007; Small 2010; Nurnberg, Kitzing et al. 2011)).

A.1.2.2 Les types de superstructures d'actine

Les mono-filaments d'actine ne sont pas assez rigides pour produire une force mécanique mais doivent s'organiser en superstructure ou structure d'ordre supérieur, c'est à dire un arrangement d'un ensemble de filaments, par des protéines de liaison à l'actine (Pak, Flynn et al. 2008).

Les superstructures d'actine sont multiples et s'organisent en réseaux, localisés sous la membrane plasmique où ils constituent un maillage bi-dimensionnel associé à la membrane, ou forment un réseau tri-dimensionnel de fibres conférant un aspect gélatineux au cytosol (Figure 4). Elles peuvent également arranger l'actine en filaments parallèles ou antiparallèles, pour les arrangements serrés des filopodes ou les arrangements contractiles des fibres de stress, respectivement (Alberts, Wilson et al. 2008).

Des protéines interagissant avec l'actine ont été identifiées comme régulatrices de l'organisation des différentes superstructures. Ces protéines sont impliquées dans des fonctions aussi diverses que la consolidation des filaments (ex : α -actinine, Myosine, Filamine), la formation de faisceaux de filaments ou câbles (ex : Fimbrine, Fascine, Filamine), le mouvement sur les filaments (ex : Myosine II) ou encore l'ancrage des filaments à la membrane plasmique (ex : Spectrine, Filamine). Récemment de nouvelles organisations du cytosquelette d'actine sous la forme de câbles parallèles périnucléaires ancrés au niveau de l'enveloppe nucléaire (coiffe d'actine, ligne TAN) ont été identifiées (Khatau, Hale et al. 2009; Luxton, Gomes et al. 2010). Les caractéristiques de ces superstructures seront détaillées à la fin de la partie A.

Tous ces jeux de protéines liant l'actine peuvent agir de façon coopérative dans le but d'engendrer les mouvements de la surface des cellules, de permettre le remodelage de la membrane plasmique lié à l'adhésion et la locomotion cellulaire, et enfin de contrôler la morphologie du noyau.

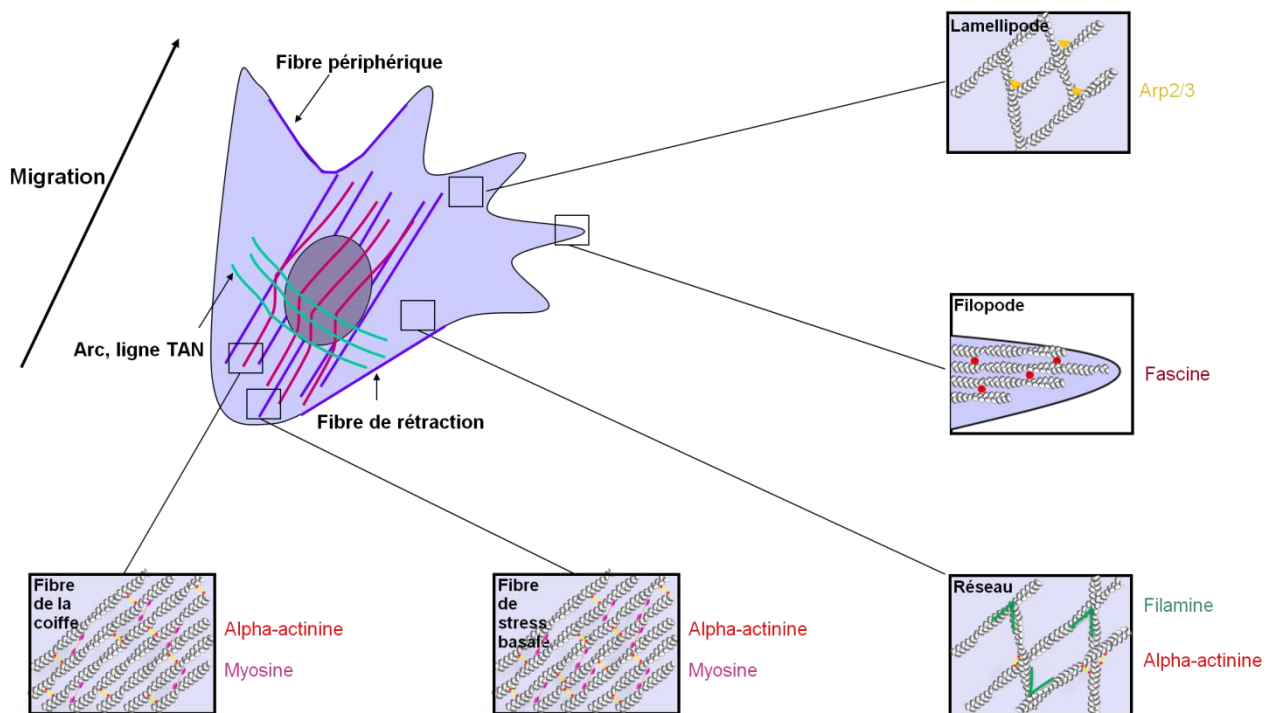


Figure 4 : Les différentes organisations d'actine dans la cellule et les protéines organisatrices.

Dans la cellule, l'actine peut être sous forme de fibres (dans la coiffe, fibres de stress ou filopodes), sous forme de réseaux (dans les lamellipodes) ou en maille (dans le cytosol). Il existe une grande variété de protéines organisant les différentes structures, seules quelques unes sont représentées sur ce schéma.

A.1.2.3 Les protéines de stabilisation et de réticulation de l'actine.

Plus particulièrement, les protéines de réticulation vont permettre d'associer des filaments entre eux afin de former des réseaux ou des câbles mais aussi de participer à l'ancrage des filaments aux membranes (Tableau II et Figure 5).

Famille de protéines	Propriétés d'organisation d'actine
Spectrine	Les tétramères organisent les filaments en réseaux orthogonaux lâches car les domaines de liaison à l'actine (ABDs) sont distants de 200nm. Elle apporte un soutien mécanique.
Fimbrines/Plastines	Les monomères organisent les filaments en câbles parallèles car possèdent 2 ABDs distants de 14nm
α -actinine	Les dimères organisent les filaments en câbles peu compacts car les ABDs des 2 chaînes sont distants de 30nm
Filamine	Les dimères présentent une forme en V, sont flexibles et organisent les filaments en réseaux orthogonaux ou câbles

Tableau II : Protéines de réticulation des filaments d'actine.

Dans ce tableau sont représentées quelques protéines organisant les filaments d'actine. Elles présentent des caractéristiques propres pour l'organisation des filaments en réseaux ou en câbles.

D'après (Siripala and Welch 2007; Siripala and Welch 2007; Alberts, Wilson et al. 2008).

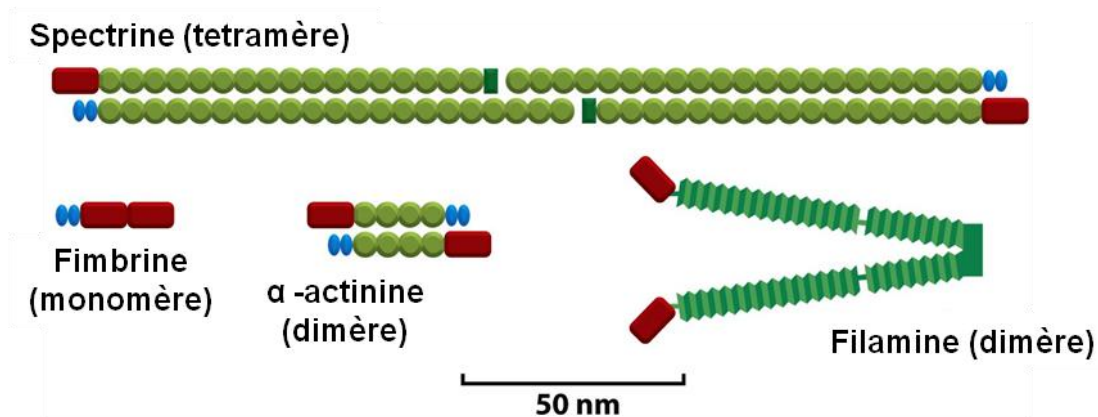


Figure 5 : Schéma de l'organisation des protéines de réticulation des filaments d'actine.

Les protéines organisatrices d'actine peuvent être sous forme de monomère, dimère ou tétramère. Les rectangles rouges représentent des domaines de liaison à l'actine.

D'après (Alberts, Wilson et al. 2008).

La Filamine, que nous étudierons plus loin, est une protéine de réticulation qui peut assurer ces trois fonctions (organisation en réseaux ou en câbles et ancrage des filaments aux membranes) selon la concentration et son interaction avec des protéines partenaires dans la cellule. L' α -actinine organise aussi des réseaux orthogonaux ou bien des câbles parallèles, car la protéine est flexible et possède les sites d'interaction avec l'actine à ses extrémités. L'architecture du réseau dépendra de l'affinité de l' α -actinine pour les filaments d'actine et de sa concentration (Wachsstock, Schwartz et al. 1993).

Il est donc intéressant de noter que les organisations en superstructures par une molécule donnée sont modulables en fonction des paramètres protéomiques de la cellule.

Les protéines de régulation organisent l'actine en superstructures pour permettre notamment le processus de migration. Celui-ci sera donc brièvement décrit afin de situer quelques acteurs et processus associés aux modifications du cytosquelette d'actine impliqués dans ce contexte.

A.1.3 Un exemple de fonction des organisations d'actine : la migration.

Chez les mammifères, les déplacements cellulaires s'effectuent par un mouvement de rampement et sont le résultat de l'intégration des filaments du cytosquelette, de leurs régulateurs et des moteurs moléculaires (Alberts, Wilson et al. 2008). Le processus de migration est un cycle complexe qui résulte de forces de poussée par polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule et de traction par la contraction des fibres d'actine de façon Myosine-dépendante à l'arrière (Figure 6) (Small 2010).

La vitesse de protrusion du lamellipode est augmentée lorsque des adhésions ancrent les filaments d'actine au substrat et ainsi bloquent leur mouvement rétrograde et augmentent la force de poussée provenant de la polymérisation (modèle de « clutch ») (Vicente-Manzanares, Ma et al. 2009).

Il existe différents types d'adhésions à la matrice extracellulaire possédant chacune des propriétés respectives. Parmi elles, les complexes focaux sont de petits sites d'adhésion à l'avant de la cellule et permettent la migration rapide. Sous une force de tension, ces sites d'adhésion se regroupent pour former un complexe plus large, les adhésions focales qui sont, au contraire, beaucoup plus stables et ont tendance à bloquer la migration (Webb, Parsons et al. 2002).

Les Intégrines sont les constituants majeurs des adhésions focales et sont un lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. Elles permettent de générer un mouvement à partir de la contraction acto-myosine et de transmettre la tension aux sites d'adhésion (Alberts, Wilson et al. 2008). Une fois activées par la liaison d'un ligand, les Intégrines transmettent un signal qui sera modulé par les petites GTPases et d'autres protéines régulatrices, dont la FilamineA, modulant l'activation de l'Intégrine- $\beta 1$ et l'étalement cellulaire (Ridley, Schwartz et al. 2003; Kim, Nakamura et al. 2010).

Les Intégrines seront également responsables de réorganisations des filaments du cytosquelette et transmettront des tensions mécaniques au noyau (Maniotis, Chen et al. 1997). Après l'avancée de la protrusion frontale, la traction de la traine se produit et on observe le phénomène de translocation nucléaire au cours duquel le noyau se déplace en direction de la migration via les réseaux de microtubule et d'actine (Figure 6). Pour l'instant le processus de translocation nucléaire demeure peu décrit mais dépend d'une structure périnucléaire spécifique, le « complexe LINC » (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), liant le cytosquelette au noyau et que nous développerons en fin de chapitre.

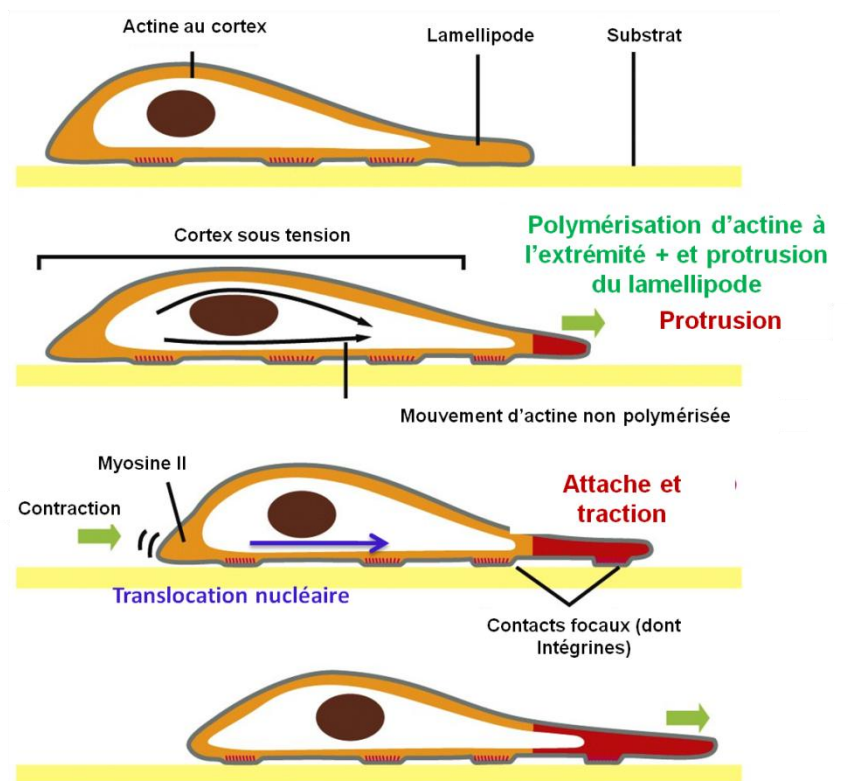


Figure 6 : Schéma du mécanisme de migration cellulaire.

Voir paragraphes précédents pour détails.

D'après (Alberts, Wilson et al. 2008).

Afin de comprendre les rôles des protéines régulatrices d'actine dans le remodelage de la membrane plasmique, je vais maintenant décrire brièvement les différentes superstructures d'actine existantes.

A.2 Structures protrusives larges : les lamellipodes

Dans la cellule, il existe 2 structures majeures en réseaux, les lamellipodes et les vagues (« ruffles »). Ces dernières sont des protrusions membranaires n'interagissant pas avec le substrat du fait de leur forme recourbée vers le haut ; elles participent en revanche au processus de phagocytose (Chhabra and Higgs 2007). Nous ne décrivons ici que l'organisation des lamellipodes.

Les lamellipodes sont des avancées larges et plates en 2 dimensions, parallèles au substrat et constituées d'un réseau d'actine branché (Pollard and Borisy 2003). Ce sont des extensions de la membrane plasmique à l'avant de la cellule impliquées dans la migration des cellules. Ils résultent de la différence entre la polymérisation d'actine et le mouvement rétrograde des filaments (déplacement des

filaments en direction de l'extrémité pointue, c'est-à-dire de la région membranaire au centre de la cellule) dû au phénomène de treadmilling.

Ce qu'on définit généralement comme « lamellipode » est un réseau branché composé en fait de deux parties : le lamellipode et le lamellum, qui présentent des caractéristiques communes mais peuvent être discriminés (Tableau III).

	Lamellipode	Lamellum
Dimensions et localisation	- à 1-3 μm du bord avant - 200nm d'épaisseur	entre le lamellipode et le corps cellulaire (jusqu'à 15 μm dans la cellule)
Ancrage et dynamiques	- moins ancré au substrat que le lamellum - plus dynamique grâce au mouvement rétrograde d'actine	- interagit avec le substrat - moins dynamique que le lamellipode
Formation	- majeur site d'incorporation d'actine dans la cellule - nucléé par le complexe Arp2/3	Nucléé par mDia
Fonction	permet la migration, l'étalement et également l'établissement des adhésions au substrat	

Tableau III : Différences entre le lamellipode et le lamellum.

D'après (Small, Stradal et al. 2002; Pollard and Borisy 2003; Ridley, Schwartz et al. 2003; Chhabra and Higgs 2007; Delorme, Machacek et al. 2007).

Une fois le réseau d'actine généré, un système de consolidation et d'ancrage à la membrane est nécessaire. La FilamineA ancre le cytosquelette d'actine en liant son extrémité N-terminale à l'actine, sa partie C-terminale à des protéines transmembranaire (les Intégrines, les Glycoprotéines) et sert également de plateforme pour des molécules de signalisation telles que des petites GTPases et leurs régulateurs (Bellanger, Astier et al. 2000; Stossel, Condeelis et al. 2001).

L' α -actinine, qui organise l'actine en réseaux et câbles, est localisée dans l'ensemble du lamellipode et elle aurait un rôle semblable.

A.3 Structures en câbles

On englobe sous le terme « câble » à la fois les fibres de stress ainsi que les protrusions fines telles que les filopodes, microvilli ou microspikes.

Les protrusions fines présentent un diamètre inférieur à 200 nm et sont composées de 10 à 30 filaments d'actine organisés de façon parallèle avec le bout barbé en direction de la membrane de la cellule (Chhabra and Higgs 2007). Les microspikes sont des câbles d'actine parallèles au sein du lamellipode alors que les filopodes se projettent au-delà et les microvilli diffèrent des derniers car n'adhèrent pas au substrat (Small, Stradal et al. 2002). Nous décrirons dans le sous-chapitre suivant uniquement les filopodes.

Les fibres de stress, composées également de 10 à 30 filaments d'actine, sont de courts câbles contractiles responsables de l'adhésion, la motilité et la morphogénèse des cellules non-musculaires (Naumanen, Lappalainen et al. 2008). Au cours des dernières années, un débat s'était organisé autour du fait que les fibres de stress n'étaient potentiellement que des artéfacts liés aux méthodes de culture cellulaire et n'existaient pas de façon physiologique (Hay 2005). D'après des études récentes, il semble que ces structures existent bien *in vivo* dans les myofibroblastes, les cellules myoépithéliales ou encore les péricytes (Pellegrin and Mellor 2007).

A.3.1 Les filopodes

Les filopodes ont tout d'abord été décrits comme senseurs et explorateurs de l'environnement (Pak, Flynn et al. 2008). Récemment, leur implication dans des processus plus larges a été abordée, tels que la fermeture de la couche épithéliale durant le développement, l'invasion cellulaire ou le guidage axonal (Mejillano, Kojima et al. 2004).

Le mécanisme d'assemblage des filopodes est un sujet encore discuté. Le premier modèle de réorganisation est l'« élancement convergent » par transition d'une organisation en réseau à une organisation en câbles (Svitkina, Bulanova et al. 2003; Vignjevic, Yazar et al. 2003). Dans ce modèle, le réseau dendritique d'un lamellipode préalablement nucléé par Arp 2/3 est réorganisé par fusion des bouts barbés puis élancement grâce aux protéines Ena/VASP à activité anti-capping, entre autres (Svitkina, Bulanova et al. 2003; Vignjevic, Kojima et al. 2006) ; c'est un processus de recyclage qui constitue un gain de temps et d'énergie pour la cellule.

Le fait que des filopodes aient été observés en l'absence de Arp2/3 plaide en faveur d'un modèle alternatif pour la formation de ces structures (Chhabra and Higgs 2007). Ce second modèle nécessite une étape de nucléation, probablement par les formines, suivi d'une élancement. Une étape finale de câblage, commune aux 2 modèles, serait ensuite requise et effectuée vraisemblablement par les fascines (Chhabra and Higgs 2007; Pollard 2007). On retrouve également la FilamineA au niveau des filopodes où elle est recrutée et activée par la petite GTPase RalA dans les fibroblastes murins NIH3T3 (Ohta, Suzuki et al. 1999).

A.3.2 Les fibres de stress

Au sein des fibres de stress, les filaments d'actine sont alignés de façon parallèle ou antiparallèle et sont décorés de motifs périodiques en alternance d' α -actinine et de Myosine IIA et IIB non-musculaire ce qui leur confère des propriétés contractiles (Hotulainen and Lappalainen 2006; Naumanen, Lappalainen et al. 2008). Les fibres de stress procurent uniquement une force de

contraction : elles ne cyclent pas entre des périodes de contraction/relaxation mais au contraire sont contractées en continu avec des moments occasionnels de relaxation ou d'étirement (Peterson, Rajfur et al. 2004).

La présence d' α -actinine est un des éléments qui conditionne la formation des fibres de stress. On retrouve cependant d'autres protéines le long des fibres de stress, notamment la Tropomyosine, la Fascine, des protéines LIM, la Palladine ou la FilamineA (Wang, Ash et al. 1975; Ronty, Taivainen et al. 2004; Pellegrin and Mellor 2005). Ce sont les spécificités de structure de ces protéines qui imposent un arrangement particulier aux fibres.

L'assemblage des fibres de stress est régulé par des cascades de signalisation par la GTPase RhoA. D'une part la forme RhoA-GTP active ROCK (Rho kinase) qui catalyse la formation des fibres par l'augmentation de la contractilité par l'activité ATPase de la Myosine II non-musculaire (Katoh, Kano et al. 2001). ROCK active également la voie LIM kinase qui augmente la stabilité des fibres de stress par inhibition de la dépolymérisation des filaments via l'inactivation indirecte d'ADF/Cofiline.

A.3.3 Les divers types de fibres de stress

On considère souvent qu'il existe 3 types de fibres de stress : ventrales, dorsales et les arcs transverses, dont la composition et le mécanisme de formation ont été étudiés de façon approfondie (Hotulainen and Lappalainen 2006; Naumanen, Lappalainen et al. 2008). Un tel classement ne reflète pas véritablement la fonction des fibres de stress. De plus, il ne permet pas de distinguer des types supplémentaires tels que les fibres de rétraction à l'arrière de la cellule et la coiffe d'actine (Khatau, Hale et al. 2009) ou la ligne TAN (Luxton, Gomes et al. 2010) au dessus du noyau. La figure 7 schématise ces diverses structures d'actine que l'on retrouve dans la cellule et le tableau IV permet de discerner leurs caractéristiques communes et différences.

Pour cela, nous utiliserons cette classification uniquement pour comprendre les mécanismes de formation et pour retracer les connaissances actuelles sur les fibres de stress.

Classement conventionnel	Organisation	Obtention	Classement phénotypique et fonctionnel
Dorsales	une extrémité se lie aux adhésions focales, l'autre « monte » dans la partie dorsale	polymérisation de nouveaux filaments d'actine	-
Arcs transverses	- pas d'interaction avec les adhésions focales mais avec les fibres de stress dorsales - sous la surface dorsale, incurvés	assemblage de courts câbles préexistants	Arcs
			ligne TAN ??
Ventrales	les 2 extrémités se lient aux adhésions focales	réorganisation des fibres de stress ventrales et des arcs	Fibres de retraction
			Câbles périphériques concaves
			Coiffe d'actine

Tableau IV: Les différentes organisations d'actine en fibres.

D'après (Small and Resch 2005; Hotulainen and Lappalainen 2006).

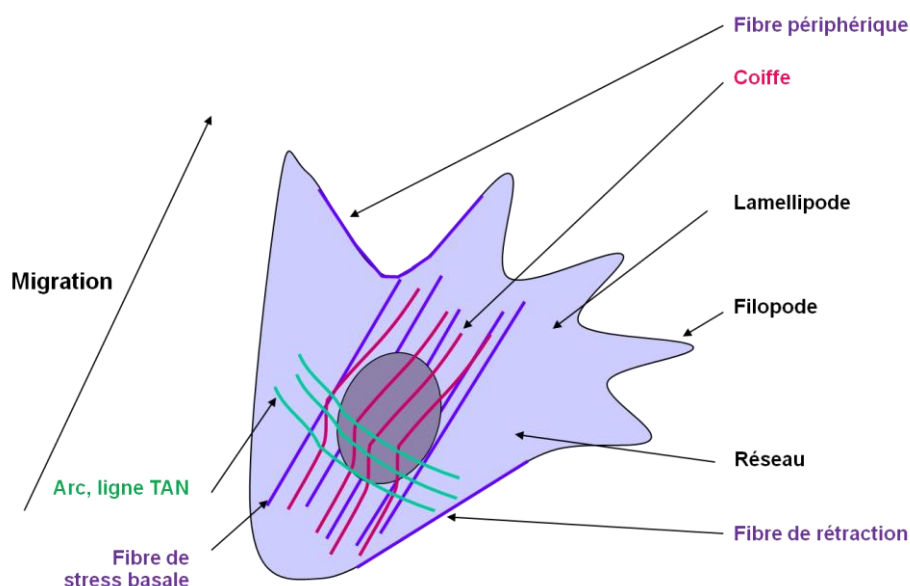


Figure 7: Les différentes organisations « non-conventionnelles » d'actine dans la cellule en migration.

Dans la cellule, le réseau d'actine peut être sous forme de fibres (coiffe, fibres de stress, arcs transverses, ligne TAN, fibres de rétraction, fibres périphériques ou filopodes) ou sous forme de réseaux, dans les lamellipodes ou en mailles plus lâches au centre de la cellule.

A.3.3.1 Les fibres de stress dorsales

Elles se forment au niveau de complexes focaux générés localement puis nucléation, majoritairement par les Formines mDia1/DRF1 activées par RhoA, mais à priori pas exclusivement (Watanabe, Madaule et al. 1997; Pollard and Borisy 2003; Hotulainen and Lappalainen 2006). Ces nouveaux filaments aux contacts focaux s'allongeront et seront arrangés en fibres de stress par l' α -actinine et la Myosine II non-musculaire (Leung, Chen et al. 1996). L'intégration de ces 2 protéines se

fait successivement : l' α -actinine décore les câbles d'actine dès l'élongation et les molécules de Myosine ne s'intègrent que plus tard, déplaçant l' α -actinine. Enfin, les complexes focaux subiront une maturation en adhésions focales (Peterson, Rajfur et al. 2004).

Les fibres de stress dorsales ne constituent pas des fibres de stress au sens strict puisqu'elles ne sont pas contractiles du fait de leur polarité uniforme. Ainsi la contraction acto-myosine qui résulte normalement du glissement de filaments antiparallèles d'actine n'est pas possible (Naumanen, Lappalainen et al. 2008). Le rôle des fibres de stress dorsales serait soit de générer une force de tension, ce qui nécessitera l'ancrage de la Myosine II non-musculaire avec une structure fixe de la cellule, soit de transporter des cargos ou protéines le long de ces fibres de stress (Pellegrin and Mellor 2007).

A.3.3.2 Les arcs transverses

Les arcs transverses sont organisés de façon parallèle à l'avant de la cellule. Ils s'assemblent à partir de filaments d'actine préexistants par recyclage à l'arrière de la cellule et obtention d'une population de filaments à polarité mixte, ainsi produisant des fibres de stress contractiles (Nemethova, Auinger et al. 2008). Il est intéressant de noter qu'encore une fois les structures d'actine ne sont pas statiques mais transitent d'un état à un autre.

Plus précisément, les arcs proviendraient du repliement des filopodes en directions opposées le long du bord de la cellule (Small 1994; Small, Stradal et al. 2002) qui se condenseraient lors du déplacement en un mouvement rétrograde vers le centre de la cellule (Heath and Holifield 1993). Ils pourraient également dériver de filaments provenant du lamellipode (Zhang, Schaefer et al. 2003) qui seraient ensuite réarrangés, grâce à la flexibilité de l' α -actinine, en filaments bipolaires (Verkhovsky, Svitkina et al. 1995; Hotulainen and Lappalainen 2006).

Dans des cellules en migration, la contraction des arcs permet leur déplacement du lamellum vers l'arrière de la cellule, puis s'ensuit leur désassemblage (Hotulainen and Lappalainen 2006). Ils transmettent également une force de contraction au substrat via les fibres de stress dorsale (Naumanen, Lappalainen et al. 2008).

De plus, il apparaît clair maintenant que ces arcs sont également liés au noyau par un complexe que nous décrirons ultérieurement sous la forme de nouvelles structures : les lignes TAN.

A.3.3.3 Les fibres de stress ventrales

Les fibres de stress ventrales naissent sous forme d'arcs transverses liés en 2 points à des fibres de stress dorsales, le tout constituant des fibres reliées en 2 extrémités aux adhésions focales (Hotulainen and Lappalainen 2006).

Entre 2 points d'ancrage, des fibres de stress ventrales se forment et génèrent une force s'opposant à la tension, ce qui maintient le bord de la cellule tendu : les câbles périphériques ou câbles concaves (Small and Resch 2005; Thery, Pepin et al. 2006). Les fibres de stress ventrales sont aussi responsables, lors de la migration, des forces de traction du corps cellulaire et de rétraction de la traine par les fibres de rétraction.

A.3.4 Les fibres de rétraction

La rétraction de l'arrière de la cellule constitue la dernière étape de la migration. Le processus mis en jeu n'est pour l'instant pas élucidé complètement mais il requiert les adhésions focales à l'arrière de la cellule et une force contractile dépendante de la Myosine IIA non-musculaire (Vicente-Manzanares, Ma et al. 2009). Les fibres qui soutiennent la force de rétraction sont soit des fibres de stress ventrales (et donc à polarité mixte), soit des câbles unipolaires émanant des adhésions focales qui se réorganiseront en filaments bipolaires par mouvement latéral des filaments du lamellipode (Small and Resch 2005). La signalisation RhoA et ROCK est aussi engagée pour la retraction, dans la migration des leucocytes (Worthylake, Lemoine et al. 2001).

Ce phénomène ne semble pas solliciter uniquement des fibres de stress. En effet, on peut l'observer dans les kératocytes de poisson qui ne présentent pourtant pas ce type de fibres (Small and Resch 2005).

A.4 Nouvelles structures d'actine périnucléaires: la coiffe d'actine et les câbles d'actine ancrés à la ligne TAN

Depuis deux ans, une nouvelle structure d'actine a été identifiée sous la forme de fibres de stress parallèles au dessus du noyau, alignées dans la direction de la migration : la coiffe d'actine (« actin cap ») (Khatau, Hale et al. 2009; Wirtz and Khatau 2010). Cette structure n'entre pas dans une des classifications dites « conventionnelles » mais serait probablement un dérivé de fibres de stress ventrales puisqu'elle se lie aux adhésions focales aux deux extrémités et se trouve au dessus du noyau (Figure 8a et b).

Une seconde structure également localisée en région dorsale est celle constituée de câbles d'actine qui s'apparente aux arcs transverses car sont organisés de façon orthogonale par rapport à la direction de migration et ne sont pas liés à des adhésions focales (Figure 8a et c) (Luxton, Gomes et al.

2010). Ces filaments d'actine sont ancrés à l'enveloppe nucléaire par les lignes TAN, ensemble de protéines traversant les membranes nucléaires internes et externes. Les câbles d'actine reliés à la ligne TAN nécessitent la présence d'actine et de Myosine II non-musculaire, leur déplacement est couplé à celui du noyau et leur nombre augmente lors du mouvement nucléaire (Luxton, Gomes et al. 2010).

Pour le moment, une distinction est faite entre ces deux structures d'actine périnucléaires. Bien que les coiffes et les câbles reliés aux lignes TAN ne présentent pas les mêmes orientations ni les mêmes adhésions à la matrice (Figure 8a), il n'est pas exclu qu'elles soient en fait une unique structure adoptant des organisations distinctes selon les conditions d'étude. Par exemple, les câbles d'actine des lignes TAN ont été observées dans des conditions de migration cellulaire à confluence alors que les coiffes d'actine ont été identifiées dans un contexte de cellules uniques en condition d'adhérence sur des substrats à motifs (patterns). Au final, ces deux structures génèrent une force de tension permettant un repositionnement du noyau cellulaire (Figure 8a, schémas de droite).

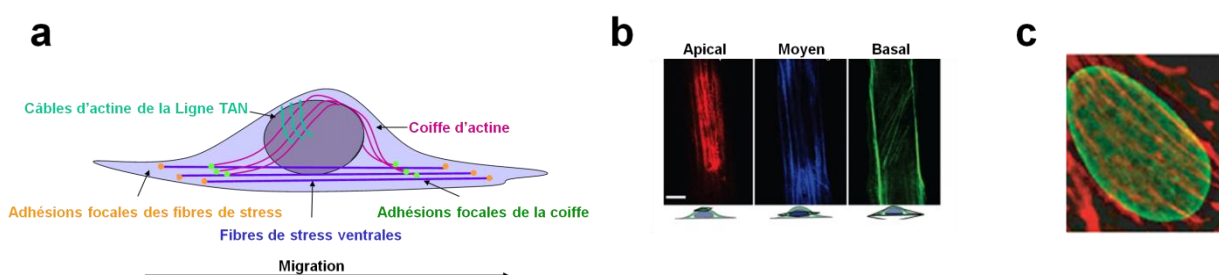


Figure 8 : Les structures d'actine périnucléaires, coiffe d'actine et ligne TAN.

a : A gauche, trois structures d'actine sont schématisées : les fibres de stress basales, la coiffe d'actine et les câbles d'actine ancrés à la ligne TAN. Les fibres de stress et la coiffe d'actine se lient au substrat par des adhésions focales, celle-ci sont distinctes selon l'organisation d'actine (représentées en vert pour la coiffe d'actine et en orange pour les fibres de stress). Les câbles attachés aux lignes TAN ne sont pas reliés aux adhésions focales.

b : La coiffe d'actine dans un fibroblaste cultivé sur micropattern observée par microscopie confocale au niveau apical (rouge), on peut également observer le réseau d'actine moyen (bleu) et basal (vert).

D'après (Khatau, Hale et al. 2009)

c : La ligne TAN est représentée (rouge) au-dessus du noyau (vert).

D'après http://www.institut-myologie.org/anglais/ewb_pages/i/interview_gomes_sept10.php

A.4.1 Fonctions de la coiffe d'actine et de la ligne TAN

A.4.1.1 La coiffe d'actine et la régulation de la forme nucléaire

En 2009, Khatau et al. observent que la morphologie du noyau des fibroblastes de souris (MEFs et NIH3T3) et de cellules endothéliales et épithéliales humaines est imposée par un réseau d'épais câbles parallèles d'actine organisés en dôme au-dessus de celui-ci, et le nomment « actin cap », soit coiffe d'actine (Khatau, Hale et al. 2009). Elle s'organise différemment selon le type cellulaire et on

l'observe sous la forme d'un réseau réticulé et non en fibres parallèles dans les cellules épithéliales humaines MCF-10A (Khatau, Kim et al. 2010). Au sein des types cellulaires à coiffe, environ 60% des cellules présentent de telles structures, car sa formation dépendrait probablement du cycle cellulaire (Khatau, Hale et al. 2009). Dans ce sens, il a été récemment montré que la perte de la coiffe corrèle avec un gain de capacité proliférative des cellules souches mésenchymales de rat (Kihara, Haghparast et al. 2011), ainsi seules les cellules en arrêt de division présenteraient une coiffe.

Cette coiffe régule la morphologie nucléaire en fonction de la forme de la cellule. Les câbles qui la constituent sont contractiles et composés de Myosine II non-musculaire phosphorylée, orientés le long de l'axe principal de la cellule, et s'ancrent à la membrane basale par des adhésions focales à la périphérie du noyau ou aux bords cellulaires. Ainsi, la forme du noyau peut être contrôlée par la géométrie des adhésions. En effet, les fibres contractiles qui y sont reliées maintiennent le noyau dans une position basale et le cernent latéralement par l'ancrage aux adhésions focales. L'absence de cette coiffe aura alors pour conséquence l'augmentation de la hauteur de la cellule (Figure 9). Des interactions entre les câbles périnucléaires d'actine et les filaments intermédiaires de l'enveloppe nucléaire (constituée des protéines lamines), sont aussi nécessaires à l'organisation de la coiffe d'actine (Khatau, Hale et al. 2009).

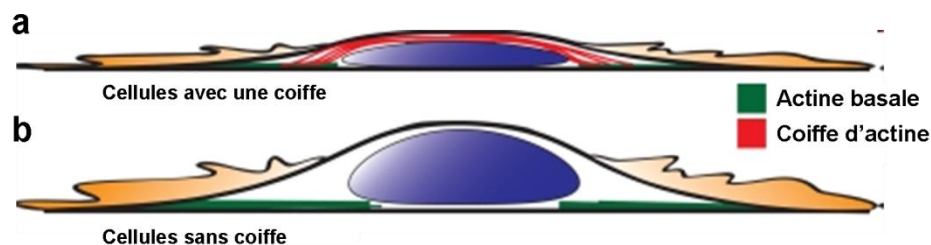


Figure 9: Représentation schématique de l'architecture d'actine au niveau basale et apical d'une cellule adhérente.

a : les fibres apicales (rouge) forment la coiffe d'actine et maintiennent le noyau plaqué vers le bas. Les fibres basales sont représentées en vert.

b : la déplétion de l'actine ou de protéines de liaison au noyau, de même que la perte de contractilité acto-myosine, empêchent l'organisation de la coiffe et sa fonction de remodelage du noyau.

D'après (Khatau, Hale et al. 2009).

Par opposition aux fibres de stress conventionnelles, la coiffe d'actine relie physiquement le noyau au stroma et pourrait donc également remplir une fonction de réponse aux forces extérieures (mécanotransduction) et aux différentes propriétés des substrats qui le composent. Elle apporte également une rigidité à la cellule, ce qui pourrait lui conférer des propriétés de résistance (Kihara 2011). Les coiffes sont plus dynamiques que les fibres de stress conventionnelles et leur régulation est indépendante de celle des fibres de stress ventrales (Khatau, Kim et al. 2010; Kihara, Haghparast et al. 2011). En effet, alors que les fibroblastes dérivés de souris portant une mutation dans la séquence de la

Lamine A (*Lmna*^{L530P/L530P}) présentent des fibres de stress ventrales intactes par rapport aux cellules contrôles (Hale, Shrestha et al. 2008) ; leurs coiffes sont désorganisées ou absentes (Khatau, Hale et al. 2009).

A.4.1.2 La ligne TAN et le mouvement nucléaire lors de la polarisation

En 2010, Luxton et al. décrivent une « ligne TAN » (transmembrane actin-associated nuclear line), composée de câbles parallèles d'actine cytoplasmique entourant le noyau au niveau dorsal (Luxton, Gomes et al. 2010). Ils montrent que les lignes TAN sont nécessaires lors de la polarisation des fibroblastes NIH-3T3 pour la migration du noyau vers l'arrière de la cellule, phénomène observé quelques années plus tôt (Gomes, Jani et al. 2005; Ostlund, Folker et al. 2009). La polarisation est cruciale pour la migration orientée ; lors de ce phénomène, les cellules réorientent leur centrosome en direction du bord avant et leur noyau en région postérieure grâce aux cytosquelettes, afin d'acquies la géométrie nécessaire au mouvement directionnel (Gomes, Jani et al. 2005; Li and Gundersen 2008).

La ligne TAN se forme lors de la phase de polarisation de la migration au niveau dorsal, tout d'abord sous la forme d'un réseau irrégulier de fibres qui se réorganise en câbles d'actine au cours de la migration. Ces câbles sont parallèles au front de migration, leur nombre augmente au cours du mouvement nucléaire et ils se déplacent vers l'arrière de la cellule. C'est sur ces arcs dorsaux d'actine que vont ensuite s'assembler les constituants de la ligne, pour s'ancrer à l'enveloppe nucléaire et permettre la transmission de force et le mouvement nucléaire dépendant de la Myosine II non-musculaire (Luxton, Gomes et al. 2010).

La figure 10 schématise la coopération entre les structures périnucléaires d'actine et la Myosine II non-musculaire pour les mouvements nucléaires au cours de la polarisation des fibroblastes, phase initiale de migration. La Myosine génère une tension (ou une rigidité structurelle) sur l'actine périnucléaire (Chancellor, Lee et al. 2010) et induit ainsi le mouvement rétrograde des fibres, ce qui au final crée une force pour le positionnement du noyau à l'arrière des centrosomes dans des cellules polarisées (Gomes, Jani et al. 2005).

Ce sont les protéines du complexe LINC qui lient le noyau aux réseaux d'acto-myosine et permettent l'ancrage du noyau aux cytosquelettes et ainsi son mouvement.

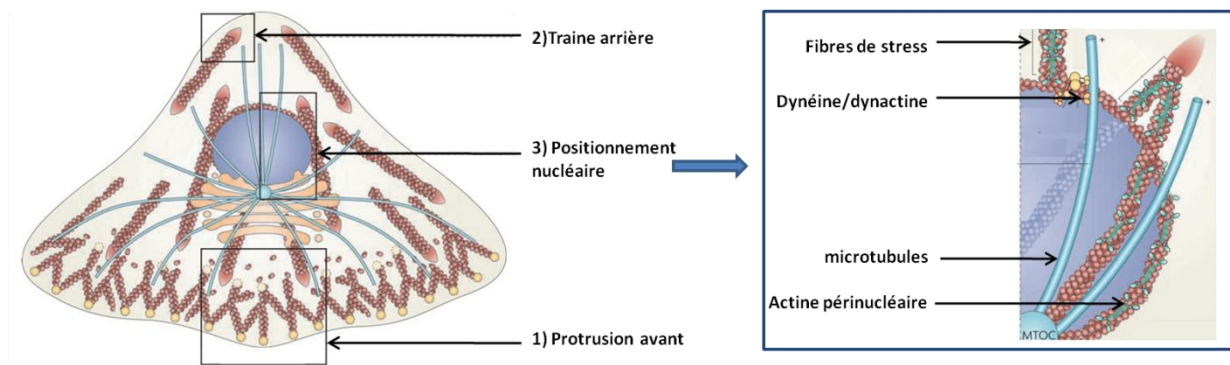


Figure 10 : Représentation schématique de la coopération entre les structures périnucléaires d'actine et la Myosine II non-musculaire pour les mouvements nucléaires au cours de la migration de fibroblastes.

Sur ce schéma sont représentées les diverses fonctions de la Myosine non-musculaire: 1) la régulation du mouvement rétrograde d'actine dans le lamellum et la maturation des adhésions, 2) le désassemblage des adhésions et la contraction acto-Myosine à l'arrière de la cellule et 3) le positionnement du noyau et l'orientation du centrosome, nécessaires à la polarisation.

D'après (Vicente-Manzanares, Ma et al. 2009).

A.4.2 Les complexes LINC : lien entre les structures d'actine périnucléaires et l'enveloppe nucléaire

Pour maintenir une tension entre le cytoplasme et le noyau, les coiffes d'actine et la ligne TAN s'ancrent au niveau de l'enveloppe nucléaire via une chaîne d'interaction mobilisant plusieurs protéines appelée « complexe LINC » (Figure 11) (Crisp, Liu et al. 2006). Au niveau de l'enveloppe nucléaire, le complexe LINC traverse les deux membranes nucléaires et crée un pont entre la Lamine nucléaire et les trois cytosquelettes (Padmakumar, Libotte et al. 2005; Schneider, Noegel et al. 2008). Les cytosquelettes interagissent avec les Nesprines ancrées dans la membrane nucléaire externe, celles-ci se lient grâce à leur domaine KASH aux protéines SUN qui traversent la membrane nucléaire interne pour rejoindre l'espace périnucléaire et faire le lien avec les Lamine nucléaires. Le complexe Lamine/protéine SUN est déterminant pour la bonne localisation des Nesprines dans l'enveloppe nucléaire (Padmakumar, Libotte et al. 2005). Ce complexe permet d'attacher le noyau aux cytosquelettes, de réguler les filaments du cytosquelette au cours des phénomènes de migration, adhésion et de polarisation et pourrait potentiellement faciliter la mécanotransduction de signaux périphériques jusqu'au noyau (Mellad, Warren et al. 2010).

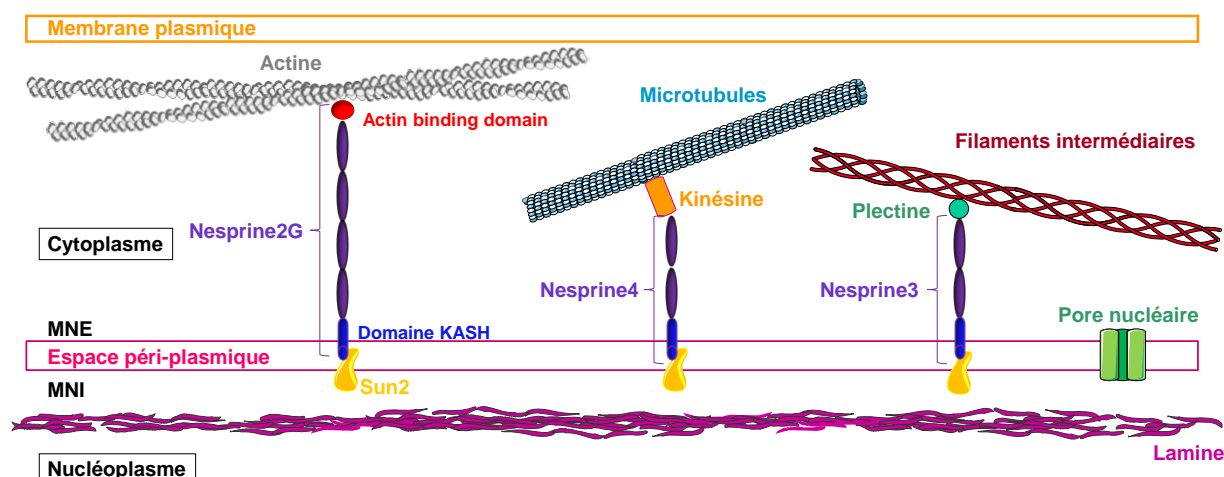


Figure 11 : Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire et des constituants du complexe LINC.

Dans le nucléoplasme se trouve le réseau de Lamina, filament intermédiaire, sous-jacent à la membrane nucléaire. Ancrés à la membrane, on retrouve les pores nucléaires et les protéines du complexe LINC : protéines SUN et Nesprines. Dans le cytoplasme, les Nesprines relient, directement ou indirectement, les filaments des 3 cytosquelettes. La Nesprine1/2 « géante » relie le cytosquelette d'actine, la Nesprine4 possède un domaine de liaison à la kinésine ce qui permet la liaison avec les microtubules et la Nesprine3 se lie aux filaments intermédiaires via la plectine.

D'après (Gruenbaum, Margalit et al. 2005; Wilhelmsen, Litjens et al. 2005; Roux, Crisp et al. 2009).

A.4.2.1 Composition et variétés des complexes LINC et leur liaison aux cytosquelettes

Les complexes LINC sont composés d'une multitude de protéines dont la fonction peut être redondante et ces complexes sont liés aux trois cytosquelettes, eux-mêmes interconnectés (Tableau V). Nous décrivons ici uniquement les trois composants majeurs : les Lamines, les Nesprines et les protéines SUN.

Nucléoplasme	Espace Périnucléaire		Cytoplasme		Fonction	Référence
	SUN	Nesprine	intermédiaire	cytosquelette		
Lamin A/C-B1	SUN1/2	Nesprine1/2	pas nécessaire	Actine	- ancrage du noyau - mécanotransduction	(Grady, Starr et al. 2005; Zhang, Xu et al. 2007)
Lamin A/C-B1	SUN1/2	Nesprine3α	pectine	kératines	couplage noyaux-filaments intermédiaires (lors de dépolymérisation de l'actine)	(Wilhelmsen, Litjens et al. 2005)
Lamin A/C-B1	SUN1/2	Nesprine4	Kinésine1	microtubules	polarité épithéliale	(Roux, Crisp et al. 2009)
Lamin A/C-B1	SUN1/2	Nesprine1/2	dynéine/ dynactine ou kinésine1	microtubules	migration neuronale	(Zhang, Lei et al. 2009)

Tableau V: Résumé des complexes LINC possibles et leurs composants.

Le noyau est relié au cytosquelette par le complexe LINC. De façon simplifiée, les protéines Lamina, SUN et Nesprine relient le noyau aux cytosquelettes. La liaison à l'actine est directe mais nécessite des protéines supplémentaires pour l'interaction avec les microtubules ou filaments intermédiaires. Seules les chaînes d'interaction majeures sont représentées, elles peuvent être davantage complexes.

Il existe différents complexes LINC selon les types tissulaires du fait de la variabilité des propriétés biomécaniques issues de l'interaction noyau-cytosquelette au sein des cellules qui le constituent. Ceci s'observe par exemple dans les situations pathologiques où des mutations sur les Nesprine1 et 2 sont responsables de la dystrophie d'Emery-Dreifuss qui touche essentiellement les muscles alors que ces mêmes mutations ont très peu d'impact sur d'autres tissus (Zhang, Bethmann et al. 2007). Egalement, certains constituants du complexe sont spécifiques d'un type cellulaire, comme la Nesprine4 qui n'est exprimée que dans les épithéliums sécrétoires (Roux, Crisp et al. 2009).

Il doit donc exister des mécanismes de régulation pour l'éventuelle transition d'un complexe LINC à un autre lors de changements d'organisation de l'actine, notamment.

A.4.2.2 Les Lamines

Les Lamines sont des protéines de la famille des filaments intermédiaires organisées en réseaux et localisées du côté nucléoplasmique. Elles sont les constituants majeurs de la lame nucléaire qui organise le complexes LINC. Les Lamines déterminent la forme et la taille du noyau, le positionnement des pores nucléaires et agissent comme « absorbeurs de chocs » pour la protection du noyau lors de déformations (Gruenbaum, Margalit et al. 2005; Houben, Ramaekers et al. 2007; Lee, Hale et al. 2007; Dahl, Ribeiro et al. 2008). Les fibroblastes embryonnaires issus du modèle murin de dystrophie musculaire dépourvus en Lamine A/C (cellules MEF *lmna*^{-/-}) présentent un défaut de migration, de mécanotransduction et de ségrégation des MTOC car n'interagissent plus avec le cytosquelette avoisinant (Broers, Peeters et al. 2004; Lammerding, Fong et al. 2006). L'intégrité de la lame nucléaire est donc déterminante pour l'organisation des propriétés du cytosquelette et de polarisation cellulaire (Lee, Hale et al. 2007).

Chez les mammifères, deux types de Lamines sont exprimés: les Lamines de type A codées par le gène *LMNA*, produisant principalement les protéines Lamine A et C, et celles de type B codées par les gènes *LMNB1* et *LMNB2* et produisant les Lamines B1 et B1, respectivement (Friedl, Wolf et al. 2011).

Chez l'Homme, des mutations sur le gène de la Lamine de type A et de la Lamine de type B sont associées à des syndromes dégénératifs héréditaires, incluant des dystrophies musculaires, des lipodystrophies, du diabète, des dysplasies squelettiques, des défauts de la peau, des cardiomyopathies, des neuropathies et des vieillissements prématurés (De Sandre-Giovannoli, Bernard et al. 2003; Eriksson, Brown et al. 2003; Worman and Bonne 2007; Zhong, Wilson et al. 2010). Dans la plupart des cas, ces mutations affectent la mécanistique nucléaire dans les tissus sujets aux tensions (Dahl, Ribeiro

et al. 2008). Alors que l'expression de la Lamine A/C débute dès l'embryogenèse, l'apparition des phénotypes des laminopathies liées aux mutations sur le gène a lieu après la naissance. Ceci reflète la probable importance des Lamines A/C pour la régulation de l'homéostasie post-natale, surtout dans le cas de cellules d'origine mésenchymateuse soumises à un remplacement constant durant la vie (Pittenger, Mackay et al. 1999; Wilson 2000).

La découverte de la coiffe d'actine et de son rôle dans la morphologie nucléaire ainsi que l'observation de son absence dans les fibroblastes embryonnaires issus des modèles murins de dystrophie musculaire (*lmna*^{-/-}) et de progéria (*lmna*^{L530P/L530P}) révèle la possible implication des structures périnucléaires d'actine dans ces syndromes (Lammerding, Fong et al. 2006 ; Hale, Shrestha et al. 2008; Khatau, Hale et al. 2009).

A.4.2.3 Les Nesprines

Il existe 4 gènes (*SYNE1-4*) chez les mammifères codant pour les Nesprines 1-4 et leurs divers variants (Starr 2007; Schneider, Noegel et al. 2008). Les Nesprines (« **n**uclear **e**nvelope **s**pectrin repeat proteins ») sont caractérisées par une région centrale de taille variable composée de domaines spectrine dont le nombre peut grandement varier et un ou plusieurs domaines KASH (**K**larish/**A**NC-1/**S**yne **h**omology) en C-terminal pour l'ancrage à l'enveloppe nucléaire (Gruenbaum, Margalit et al. 2005; Mellad, Warren et al. 2010).

Au niveau N-terminal des Nesprines, existent des motifs d'interaction avec les différents cytosquelettes. Les plus décrits sont les Nesprines 1 et 2 « géantes » (Nesprine 1/2 G de 1000 ou 800 kDa, respectivement) qui possèdent un domaine de liaison à l'actine composé de deux « calponin homology », la Nesprine3 se liant aux filaments intermédiaires via la plectine et la Nesprine4 qui interagit directement avec les microtubules (Gruenbaum, Margalit et al. 2005; Mellad, Warren et al. 2010).

Les Nesprine 1/2 G possèdent un grand nombre d'isoformes et ont acquis divers noms au fil de leur découverte (« syne-1 », « myne-1 » et « Enaptin » pour la Nesprine1 et « syne-2 », « myne-2 » et « NUANCE » pour la Nesprine2). Selon des modèles de prédiction *in silico*, leur structure présenterait la forme d'une tige étendue sur 300 à 400 nm dans le cytoplasme (Zhang, Ragnauth et al. 2002).

Les Nesprines sont impliquées dans un grand nombre de syndromes humains. Des mutations sur les Nesprines1 et 2 peuvent provoquer des anomalies musculaires, c'est le cas de la dystrophie de Emery-Dreifuss (EDMD) qui touche les muscles squelettiques et cause des défauts cardiaques (Zhang, Bethmann et al. 2007). On retrouve également le syndrome neurodégénératif « ataxie spinocérébelleuse » suite à des mutations de la Nesprine1 (Gros-Louis, Dupre et al. 2007).

A.4.2.4 Les protéines SUN de la membrane interne

Les protéines SUN sont situées dans l'espace périnucléaire et traversent la membrane interne pour interagir avec la Lamine (Haque, Lloyd et al. 2006). Les protéines à domaine KASH (dont les Nesprines) se lient aux protéines SUN1 ou SUN2, ce qui permet leur ancrage à l'enveloppe nucléaire (Razafsky and Hodzic 2009).

Il existe d'autres composants du complexe LINC qui peuvent se substituer aux protéines SUN. La Torsin1A, notamment, peut endosser le rôle des protéines SUN dans des conditions où elles sont absentes grâce à sa capacité de liaison aux protéines à domaine KASH (Nery, Zeng et al. 2008).

Parmi les protéines impliquées dans l'attache du cytosquelette d'actine au noyau, j'ai identifié la FilamineA, ceci sera développé dans la première publication de la partie « Résultats ».

Mais avant cela, le chapitre suivant permettra de décrire cette protéine, son organisation ainsi que sa fonction.

B. Les Filamines et Refilines, protéines organisatrices du cytosquelette d'actine

Les Filamines forment une famille de protéines qui contribuent à l'organisation, la stabilité et la dynamique des filaments d'actine ainsi qu'à la mécanoprotection (Glogauer, Arora et al. 1998; D'Addario, Arora et al. 2001). Elles permettent l'ancrage du cytosquelette par l'interaction à des protéines d'adhésion cellulaire transmembranaires telles que GPIIb α et les Intégrines (Pfaff, Liu et al. 1998; Calderwood, Huttenlocher et al. 2001; Feng, Lu et al. 2005). Elles constituent également des échafaudages cellulaires (« scaffold »), capables d'interagir avec plus de 70 protéines de la signalisation cytosolique, transmembranaire ou des canaux ioniques (Figure 14 et Tableau XIV en annexe).

Dès 1975, la FilamineA a été identifiée et isolée à partir de gésiers de poulet (Wang, Ash et al. 1975) et de macrophages de lapin (Hartwig and Stossel 1975), puis caractérisée comme protéine organisatrice de l'actine en câbles et en réseaux (Wang and Singer 1977).

B.1 La famille des Filamines

La famille Filamine existe chez les eucaryotes multicellulaires et les formes les mieux étudiées sont celles de *dictyostelium discoideum* (ddFLN) et celles des mammifères (Popowicz, Schleicher et al. 2006). Chez l'Homme, il existe trois membres dans la famille, la FilamineA, la FilamineB et la FilamineC (séquences obtenues du site de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, NP_001447.2, NP_001448.2 et NP_001449.3, respectivement) (Stossel, Condeelis et al. 2001; van der Flier and Sonnenberg 2001).

On peut retrouver la FilamineA sous les noms « ABP-280 » (Gorlin, Yamin et al. 1990) ou « Filamine1 », la FilamineB sous « ABP-278/276 », « β -Filamine » ou « Filamine3 » et la FilamineC sous « γ -Filamine », « ABPL » ou « Filamine-2 » (Thompson, Chan et al. 2000; van der Flier, Kuikman et al. 2002).

Les 3 protéines (que l'on retrouve souvent décrits dans la littérature comme « isoformes ») sont le produit de trois gènes distincts (Tableau VI) qui partagent au minimum 64% d'homologie en acides aminés (Kesner, Milgram et al. 2010). Ils seraient issus d'une duplication d'un gène ancestral produisant le gène unique des urochordés d'une part, et les progéniteurs des trois Filamines des vertébrés d'autre part (Kesner, Milgram et al. 2010).

	Localisation du gène chez l'humain	Localisation du gène chez la souris
FilamineA	X	X
FilamineB	3	14
FilamineC	7	6

Tableau VI: Localisation des gènes de la FilamineA, FilamineB et FilamineC chez l'humain et la souris.

B.1.1 Les protéines de la famille Filamine : différences d'expression, de localisation et existence de variants

Alors que les FilamineA et FilamineB sont exprimées de façon ubiquitaire et localisées sous la membrane plasmique et sur les fibres de stress (Sheen, Feng et al. 2002), la FilamineC est restreinte aux muscles lisses et cardiaques et localisée à la ligne Z des sarcomères (Thompson, Chan et al. 2000). Ainsi, les syndromes liés à des mutations humaines et l'étude des modèles murins de déplétion révèlent que les FilamineA et FilamineB sont critiques pour le développement squelettique, vasculaire, cardiaque et cérébral (Sheen, Feng et al. 2002; Feng, Chen et al. 2006; Hart, Morgan et al. 2006; Lu, Lian et al. 2007; Zhou, Tian et al. 2007) alors que les mutations sur la FilamineC provoquent des anomalies musculaires (Vorgerd, van der Ven et al. 2005).

Il existe une grande diversité dans la famille des Filamines dues aux épissages alternatifs, ce qui génère un grand nombre de variants. Des formes de FilamineB et FilamineC dépourvues de région charnière H1 présentent des expressions et fonctions spécifiques dépendant des cellules et des tissus (van der Flier and Sonnenberg 2001; van der Flier, Kuikman et al. 2002; Zhou, Hartwig et al. 2009). Les niveaux d'expression pour chaque variant de FilamineB diffèrent selon les tissus (Gorlin, Yamin et al. 1990; van der Flier and Sonnenberg 2001).

Dans la suite de ce mémoire je me focaliserai sur la présentation de la FilamineA, qui est l'isoforme la plus étudiée et la mieux connue.

B.1.2 Structure de la FilamineA

On retrouve la FilamineA fonctionnelle sous forme de dimère de 2 sous-unités de 280 kDa qui s'associent pour former une chaîne semi-flexible d'une longueur de 160 nm. Sur chaque sous-unité existe un ABD en N-terminal (Figure 12). S'ensuit une répétition de vingt-quatre domaines de type-immunoglobuline (type-Ig) séparés par deux régions charnières H1 et H2 entre les répétitions 15-16 et 23-24, respectivement (Gorlin, Yamin et al. 1990). Il en résulte deux parties distinctes : les tiges 1 et 2 (« rod 1 » et « rod 2 ») composées des domaines 1-15 et 16-23, respectivement (Stossel, Condeelis et al. 2001; van der Flier and Sonnenberg 2001).

Les charnières, que l'on retrouve également dans les formes B et C, confèrent une plus grande flexibilité à la molécule de FilamineA (Gorlin, Yamin et al. 1990). La charnière H1 est nécessaire pour le maintien des propriétés viscoélastiques du cytosquelette lors du stress mécanique (Gardel, Nakamura et al. 2006) et peut être clivée par protéolyse par la calpaïne, protéase calcium-dépendante, ce qui produit un fragment de 200kDa et un autre de 90kDa (Franco and Huttenlocher 2005).

La dernière répétition (24) en partie C-terminale constitue le domaine de dimérisation et procure au dimère une forme en V permettant ensuite l'organisation des filaments d'actine en réseaux (Gorlin, Yamin et al. 1990; Nakamura, Osborn et al. 2007).

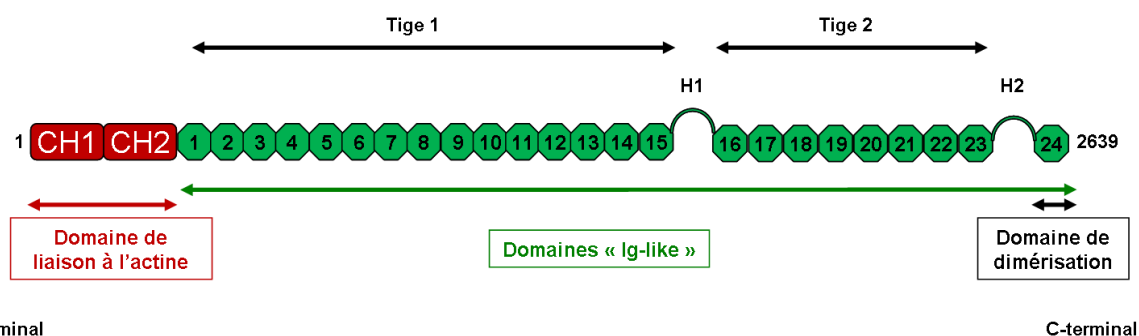


Figure 12: Représentation schématique de l'organisation de la FilamineA et de ses domaines.

En N-terminal se trouve le domaine de liaison à l'actine composé de 2 domaines « calponin homology », CH1 et CH2. S'ensuivent vingt-quatre domaines organisés en tonneaux composés de feuillets β . Les domaines 15-16 et 23-24 sont séparés des régions charnières H1 et H2 et forment les tiges 1 et 2. La dernière répétition, en partie C-terminale, constitue le domaine de dimérisation.

B.1.2.1 Le domaine de liaison à l'actine de la FilamineA

Les protéines organisatrices de l'actine sont structurellement comparables et possèdent généralement deux ABDs identiques qui se trouvent soit aux deux extrémités d'une seule chaîne polypeptidique, soit en un exemplaire sur une molécule qui s'organise en dimère, comme dans le cas de la FilamineA (Alberts, Wilson et al. 2008).

Parmi les ABDs, on retrouve la superfamille des « calponin homology »; ce motif présent sur la Filamine existe dans diverses protéines qui interagissent avec l'actine. Un ABD est formé de deux domaines calponin homology d'environ cent acides aminés (CH1 et CH2) non-similaires organisés en tandem présentant des affinités différentes pour l'actine (Gimona, DjinoVIC-Carugo et al. 2002). Bien que les ABDs composés de deux calponin homology soient présents dans un grand nombre de protéines, ils ne sont identiques ni dans leur séquence, ni dans la régulation de leur liaison à l'actine (Washington and Knecht 2008).

Au sein de l'ABD de la FilamineA, le domaine CH1 présente une affinité plus importante que CH2 pour l'actine et est relativement conservé entre les 3 Filamines (Kesner, Milgram et al. 2010) alors que CH2 semble impliqué dans l'interaction à l'actine spécifique pour chaque membre. L'interaction du domaine CH1 de la FilamineA avec l'actine est négativement régulée par la liaison de la calmoduline en présence de calcium (Nakamura, Hartwig et al. 2005); cette régulation semble spécifique de la Filamine car elle ne concerne pas l' α -actinine ou la superfamille des spectrines, protéines dont le CH1 présente pourtant des séquences similaires en acides aminés (Hartwig 1995).

La liaison d'un dimère de FilamineA avec l'actine a lieu en deux temps : d'abord une liaison de faible affinité se fera (de l'ordre du μM) entre l'ABD d'un monomère avec un filament d'actine puis l'ABD du second brin du dimère pourra se lier avec une affinité plus importante (nM) à un autre microfilament (Nakamura, Osborn et al. 2007).

Sur chaque monomère de FilamineA, une deuxième région d'interaction d'affinité inférieure à celle de l'ABD a également été identifiée au niveau des répétitions 9 à 15 (voir Figure 14) (Nakamura, Osborn et al. 2007). Elle permet d'organiser l'actine en réseaux orthogonaux et son absence induit une organisation en câbles (Nakamura, Osborn et al. 2007). D'un point de vue mécanique, cette région pourrait expliquer la résistance supérieure au stress de la FilamineA comparée à celle de l' α -actinine (qui possède uniquement un ABD pour lier l'actine) (Gardel, Nakamura et al. 2006).

B.1.2.2 Structure des domaines de type-immunoglobuline.

Les domaines, d'environ quatre-vingt dix acides aminés chacun, ont une organisation de type-Ig qui consiste en 7 brins (brin A à brin G) organisés en feuillets β et formant une structure en tonneau (Gorlin, Yamin et al. 1990; Pudas, Kiema et al. 2005).

On retrouve dans ddFLN de *dictyostelium discoideum* six domaines organisés de façon linéaire (Figure 13a) (Popowicz, Schleicher et al. 2006) alors que chez l'Homme, les organisations au sein des tiges 1 ou 2 diffèrent. En microscopie électronique, on peut observer que les répétitions de la tige 1 se succèdent (organisation linéaire), alors que la tige 2 est bien plus compacte (organisation globulaire) (Figure 13b) (Nakamura, Osborn et al. 2007; Kesner, Milgram et al. 2010). Ceci s'explique par l'appariement de certaines répétitions (16, 18 et 20) avec leur domaine voisin (17, 19 et 21, respectivement) (Lad, Kiema et al. 2007).

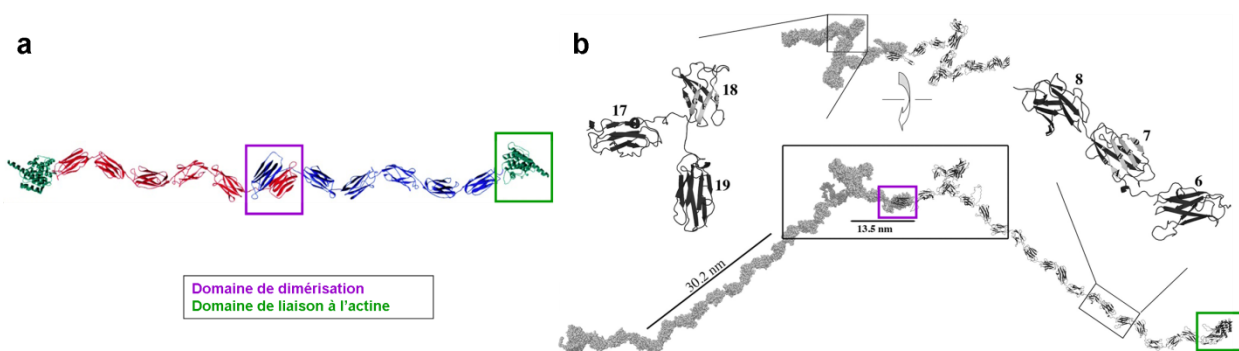


Figure 13 : Organisations des dimères de FilamineA chez *dictyostelium discoideum* et chez l'humain.

a. Modèle de la molécule complète ddFLN en homodimère. Le modèle est construit selon les parties de structures connues.

b. Modèle du dimère de FilamineA humain obtenu par modélisation des domaines homologues et des domaines de ddFLN. La tige 1 est linéaire (exemple de la triade 6-7-8) et la tige 2 est globulaire et compacte (exemple des domaines 17-18-19).

Encadrés en violet sont les domaines de dimérisation en C-terminal et en vert les domaines de liaison à l'actine en N-terminal.

Modèles issus de a : (Popowicz, Schleicher et al. 2006) et b : (Kesner, Milgram et al. 2010).

B.1.2.3 Dimérisation de la FilamineA

Tout comme pour ddFLN (McCoy, Fucini et al. 1999), le dernier domaine de la FilamineA humaine est essentiel et suffisant pour son homo-dimérisation (Gorlin, Yamin et al. 1990; Pudas, Kiema et al. 2005; Nakamura, Osborn et al. 2007). Pour l'instant, la capacité des Filamines à hétéro-dimériser n'est pas encore clairement établie. *In vitro*, les Filamines B et C pourraient hétéro-dimériser par leur domaine 24 alors qu'aucune hétéro-dimérisation ne serait possible avec la FilamineA et un autre membre (Himmel, Van Der Ven et al. 2003). Néanmoins, dans les précurseurs neuronaux, l'hétéro-dimérisation entre la FilamineA et B a été observée (Sheen, Feng et al. 2002). Il pourrait également exister une hétéro-dimérisation transitoire entre la FilamineA et C car elles sont co-exprimées dans les myotubes précoces et il y aurait un remplacement progressif de FilamineA en C au cours du développement (Price, Caprette et al. 1994).

L'avidité d'un dimère de FilamineA pour l'actine dépend de sa dimérisation, ainsi la présence du domaine 24 est requise pour sa capacité à interagir avec l'actine (Nakamura, Osborn et al. 2007). La constante de dissociation du domaine de dimérisation 24 se situe dans la gamme de la concentration cellulaire de la FilamineA, ce qui laisse penser que l'équilibre monomère/dimère pourrait être fonctionnellement important pour la dimérisation et l'interaction avec l'actine (Pudas, Kiema et al. 2005).

B.1.3 Paramètres de la FilamineA modulant l'organisation d'actine.

L'interaction avec les filaments d'actine et la réorganisation du cytosquelette d'actine est à la base des fonctions de la Filamine (Wang and Singer 1977). Ces interactions dépendent d'une multitude de facteurs tels que la concentration en FilamineA, les variants impliqués, ou encore la combinaison avec d'autres protéines effectrices ou régulatrices. Cette complexité explique la difficulté que nous avons à définir une fonction pour la FilamineA, puisqu'on la retrouve dans une multitude de configurations dans la cellule. Dans ce sous-chapitre je présenterai de façon très condensée les différents modes de régulation de la FilamineA. Une vision plus exhaustive et détaillée de ces régulations pourra être trouvée dans les revues de synthèse citées en référence.

B.1.3.1 Le rapport concentration FilamineA/actine

La FilamineA a été observée à la fois dans des organisations en fibres (Wang, Ash et al. 1975; Nagano, Yoneda et al. 2002), comme dans des avancées larges (Vadlamudi, Li et al. 2002; Popowicz, Schleicher et al. 2006; Johansen, Naumanen et al. 2008).

Tout comme pour l' α -actinine, la FilamineA peut alterner entre des fonctions d'organisatrice de réseaux et d'organisatrice de câbles parallèles lorsque sa concentration est augmentée (Nakamura, Osborn et al. 2002; Schmoller, Lieleg et al. 2009). En effet, le ratio FilamineA/actine dans les réseaux orthogonaux serait de 1/150 alors qu'il serait de seulement 1/10 dans les câbles (Jockusch, Bubeck et al. 1995) et d'environ 1/75 dans les vagues (Borm, Requardt et al. 2005). Ceci a un impact sur les propriétés du réseau d'actine car celui-ci est davantage dynamique en conditions « organisatrices de réseaux » dans les cas où la concentration est diminuée (Tseng, An et al. 2004).

B.1.3.2 Variants de la Filamine et leurs diverses propriétés

Des épissages alternatifs génèrent une multitude de variants des Filamines (22, 16 et 3 variants pour les FilamineA, B et C respectivement, sur la base de donnée « Ensembl » <http://www.ensembl.org/index.html>) (van der Flier and Sonnenberg 2001; Lad, Jiang et al. 2008). Ces variants offriraient des propriétés différentes. A titre d'exemple, les variants de la Filamine dépourvus en H1 (le plus fréquemment observés pour la FilamineC dans les muscles) présentent une flexibilité amoindrie entre les tiges 1 et 2, ce qui génère des dimères empaquetés et formant de rigides fibres d'actine (van der Flier and Sonnenberg 2001).

B.1.4 Les interactions de la FilamineA avec ses ligands

B.1.4.1 Vue générale

Les 3 protéines de la famille possèdent à elles seules environ quatre-vingt dix partenaires connus tels que des canaux, des récepteurs, des molécules de signalisation intracellulaire, et même des facteurs de transcription (Figure 14 et Tableau XIV en annexe).

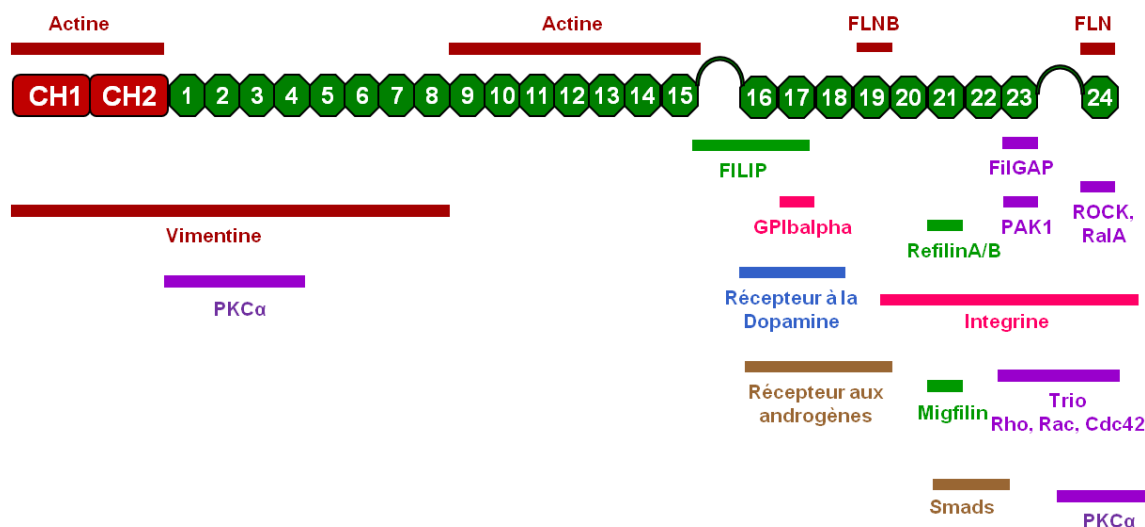


Figure 14: Schéma de la FilamineA et de ses interactants.

Des protéines du cytosquelette telles que l'actine ou d'autres Filamines (FLN, rouge), des petites protéines de signalisation (violet), des protéines nucléaires (marron) ou membranaires (rose) interagissent avec la FilamineA. On retrouve des protéines impliquées dans la régulation de la FilamineA (vert), telles que les Refilines, Migfiline ou FILIP.

Pour plus d'information, se référer à au tableau XIV dans l'annexe.

D'après (Feng and Walsh 2004; Zhou, Hartwig et al. 2009; Kim and McCulloch 2010).

Comme on peut le constater, la majorité des ligands interagissent sur la tige 2 ce qui leur permet de se rapprocher pour une éventuelle transduction de signal (Ohta, Hartwig et al. 2006). De fait, certains domaines présentent un grand nombre d'interactants ce qui crée une compétition que nous illustrerons avec l'exemple du domaine 21, notamment, domaine de liaison avec les protéines Intégrines, la Migfiline et les Refilines.

B.1.4.2 Les spécificités d'interaction des différentes Filamines

Bien que les domaines des Filamines présentent une forte homologie de séquence entre les 3 protéines, il existe des spécificités d'interaction. FilGAP (Rac-specific GTPase-activating protein) interagit avec le domaine 23 de la FilamineA, par contre cette protéine n'interagit ni avec FilamineB, ni avec la FilamineC (Nakamura, Heikkinen et al. 2009). De la même façon, la Migfiline/FBLP-1 (LIM domain containing protein/Filamine-binding LIM protein-1) peut se lier au domaine 21 des FilamineA et C (Tu, Wu et al. 2003; Ithychanda, Hsu et al. 2009) et n'interagit pas avec le domaine 21 de la FilamineB mais avec les domaines 10 à 13 (Takafuta, Saeki et al. 2003).

Les études structurales des interactions entre la FilamineA et certains de ses partenaires sur divers domaines ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'interaction de la FilamineA (Kiema, Lad et al. 2006; Nakamura, Pudas et al. 2006; Nakamura, Heikkinen et al. 2009). Il en ressort

que la liaison de la FilamineA avec ses partenaires a lieu au niveau d'une interface particulière, où les brins C et D d'un feuillet β forment une poche (ou sillon) pour permettre l'insertion d'un autre feuillet β donné par le partenaire (Figure 15) (Kiema, Lad et al. 2006; Nakamura, Pudas et al. 2006). Ceci laisse penser qu'il existe un motif conservé pour l'interaction avec la FilamineA.

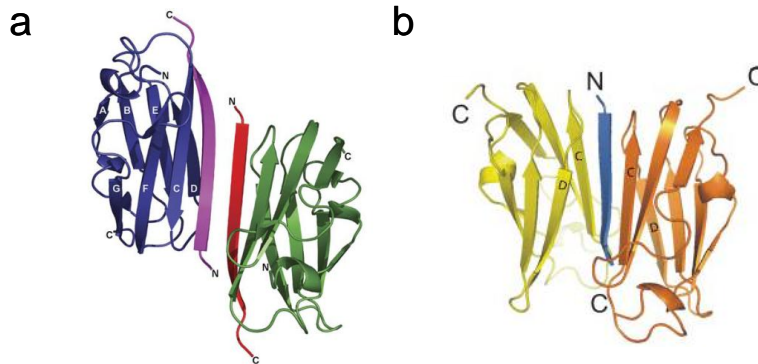


Figure 15 : Diagrammes en ruban du complexe composé de 2 molécules du domaine 21 de la FilamineA avec l'Intégrine $\beta 7$ ou avec la Migfiline.

a. Complexe de deux molécules du domaine 21 de la FilamineA (bleu et vert) avec 2 peptides Intégrine (rouge et violet). D'après (Kiema, Lad et al. 2006).

b. Complexe de deux molécules du domaine 21 de la FilamineA (jaune et orange) avec 1 peptide Migfiline (bleu). D'après (Lad, Jiang et al. 2008).

Comme les structures des sillons CD des domaines 21 des 3 isoformes de la Filamine sont pourtant très conservées, il existe donc, au sein ou au delà de cette poche, une régulation pour l'interaction.

En effet, une étude sur les divergences entre les 3 formes a révélé que les résidus critiques pour les interactions des domaines 17 et 21 n'étaient pas conservés entre les 3 protéines, bien que les domaines dans leur ensemble présentent de fortes homologues (Kesner, Milgram et al. 2010). Il a également été montré qu'il existait une régulation isoforme-spécifique pour l'interaction sur l'actine. Au final, une modulation de l'interaction et probablement de la fonction des Filamines spécifiquement pour chaque membre (Kesner, Milgram et al. 2010).

B.1.4.3 L'oligomérisation et regroupement des partenaires de la FilamineA

Des études d'interaction entre les Filamines et différents ligands révèlent qu'il existe plusieurs sites de liaison sur la Filamine pour un même partenaire pour une interaction efficace. De ce fait, un ligand doit être soit 1) sous forme de dimère, 2) posséder au minimum deux sites d'interactions avec la FilamineA ou 3) se trouver en plusieurs exemplaires au site d'interaction dans la cellule pour la liaison avec les deux sites du dimère de FilamineA (Nakamura, Pudas et al. 2006; Nakamura, Heikkinen et al. 2009).

A titre d'exemple, chacune des sous-unités transmembranaires GPIIb α , présente sous forme de dimère dans le complexe récepteur GPIIb-V-IX (platelet adhesion glycoprotein Ib-IX-V), se liera avec chacun des domaines 17 au niveau du sillon CD d'une molécule de FilamineA, elle aussi en dimère (Nakamura, Pudas et al. 2006).

De la même façon, pour obtenir un complexe de forte interaction, la FilamineA et FilGAP doivent être toutes deux sous forme de dimère et leurs surfaces d'interaction doivent être alignées ; ce qui est permis par la région charnière H2 de la FilamineA (Nakamura, Heikkinen et al. 2009).

Egalement, le rassemblement des Intégrines au niveau des adhésions focales augmente les affinités pour la FilamineA car un dimère pourra lier deux molécules d'Intégrine voisines, et ce sur 7 différents domaines par molécule (Figure 16) (Ithychanda, Das et al. 2009).

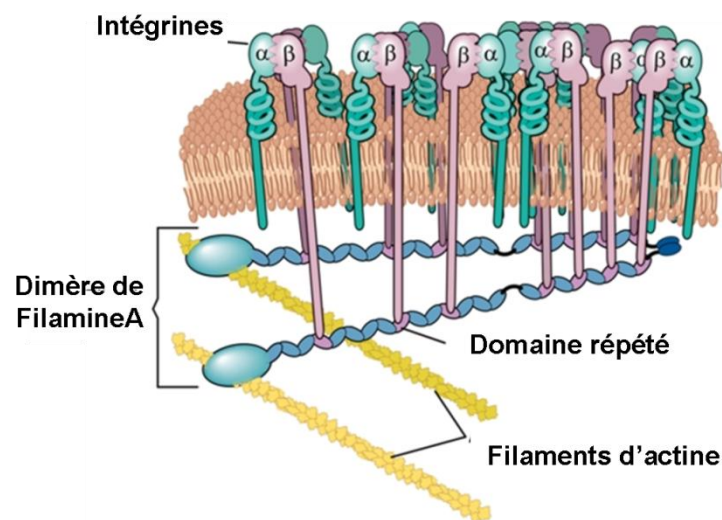


Figure 16: Schéma du regroupement des ligands par la FilamineA, exemple des Intégrines.

La FilamineA présente sept sites d'interaction avec les Intégrines et ceci permet leur recrutement et leur regroupement.

D'après (Ithychanda, Hsu et al. 2009).

B.1.4.4 Autoinhibition des domaines par leur structure en paire avec leur voisins

Les domaines de type-Ig de la FilamineA renferment des sites cryptiques, permettant de réguler les interactions avec leurs partenaires. Ces sites résultent d'un agencement particulier des domaines avec leurs voisins par autoinhibition.

Les domaines 16/17, 18/19 et 20/21 interagissent et forment des structures compactes (Lad, Kiema et al. 2007; Heikkinen, Ruskamo et al. 2009; Pentikainen and Ylanne 2009). Dans ces trois cas, le domaine pair (16, 18 ou 20) n'est pas organisé en domaine de type-Ig complet car le brin A est soit non-structuré (16) soit interagit avec le sillon CD du domaine suivant (18 et 20) (Heikkinen, Ruskamo et al. 2009). Ainsi, l'interaction Intégrine $\beta 7$ -Ig19 sera inhibée par le domaine 18, alors que le brin A du

domaine 16 n'empêchera pas l'interaction Ig17-GPIIb (Nakamura, Pudas et al. 2006; Heikkinen, Ruskamo et al. 2009).

Pour permettre au partenaire d'accéder au site cryptique, des changements dans la conformation de la tige 2 seront nécessaires. *In silico*, des simulations suggèrent que la soumission à des forces est suffisante pour exposer le site cryptique de liaison aux Intégrines (Pentikainen and Ylanne 2009).

Le domaine 19-22 est indispensable pour restaurer le phénotype de défaut d'initiation de migration et d'étalement observé dans les lignées dérivées de fibrosarcomes humains dépourvues en FilamineA et FilamineB (Baldassarre, Razinia et al. 2009). Cette région est le site d'un grand nombre d'interactions et est impliquée dans la régulation de l'activation des Intégrines et dans l'interaction avec les Refilines, notamment. Dans ce contexte, l'étude de son organisation est vitale pour la compréhension de la régulation de la fonction de la FilamineA.

L'étude cristallographique des domaines 19, 20 et 21 a révélé qu'ils adoptaient une organisation particulière car s'arrangeaient de façon non-linéaire avec le domaine 21 situé entre les domaines 19 et 20 (Figure 17) (Lad, Kiema et al. 2007). Ceci est permis par le dépliement partiel du domaine 20 formant un feuillet β interagissant avec l'interface CD du domaine 21 (Lad, Kiema et al. 2007). Par cette organisation singulière, il est proposé que la FilamineA agisse dans le phénomène de mécanotransduction où des changements conformationnels de la cellule induiraient le dépliement de la FilamineA et ainsi l'accès aux protéines se liant au domaine 21.

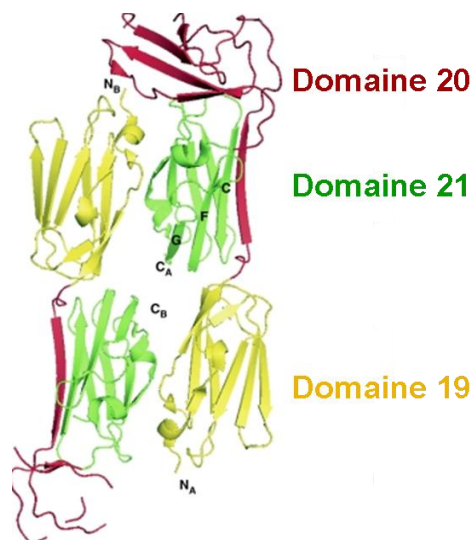


Figure 17: Organisation et structure des domaines 19-21. Diagramme en ruban obtenu à partir des cristaux des domaines 19–21.

Les domaines 19, 20 et 21, organisés en feuillets β à sept brins, adoptent un arrangement particulier. Le domaine 21 (vert) est situé entre les domaines 19 (jaune) et 20 (rouge) par dépliement partiel du domaine 20.

Barre = 25 Å
D'après (Lad, Kiema et al. 2007).

B.1.4.5 Compétitions d'interaction sur les domaines, exemple de l'activation des Intégrines sur le domaine 21

Il existe un nombre important d'interactants souvent concentrés aux mêmes domaines au sein de la tige 2 et donc générant des compétitions. L'interaction avec la FilamineA est donc soumise à une régulation.

Un premier exemple de compétition existe au niveau du domaine 21 qui peut interagir avec son domaine 20 adjacent ou avec les Intégrines (Kiema, Lad et al. 2006) et également avec la Migfiline (Tu, Wu et al. 2003) ou les Refilines. Dans ce contexte, il est intéressant d'étudier la régulation des Intégrines sur ce domaine, car elle reflète la complexité des régulations pour les interactions avec la FilamineA.

L'activation des Intégrines au niveau des adhésions focales est Taline-dépendante (Tadokoro, Shattil et al. 2003), or les sites d'interaction de la FilamineA et de la Taline sur les Intégrines se recouvrent, ce qui crée une compétition entre la FilamineA et la Taline, impactant directement sur l'activation (Figure 18a et b) (Kiema, Lad et al. 2006). Une molécule supplémentaire, 14-3-3, se lie sur ce même site sur les Intégrines et il semble que la phosphorylation de la queue cytoplasmique des Intégrines régule de façon négative l'interaction des Filamines et favorise alors la liaison de 14-3-3, résultant en une augmentation de l'étalement et *in fine* de la migration cellulaire (Figure 18c) (Kiema, Lad et al. 2006; Takala, Nurminen et al. 2008; Legate and Fassler 2009).

De plus, il existe une compétition sur le domaine 21 de la FilamineA, qui constitue à la fois le site d'interaction des Intégrines et de la Migfiline (Lad, Jiang et al. 2008), qui entraînera une compétition et modulera l'activation des Intégrines à un niveau supplémentaire (Figure 18d) (Ithychanda, Das et al. 2009).

De telles compétitions instaurent un environnement dynamique pouvant être finement régulé par la concentration et l'expression de chaque partenaire, ce qui explique l'association/dissociation des adhésions focales, dans cet exemple précis (Legate and Fassler 2009). Un niveau de régulation additionnel se fait par les calpaïnes qui peuvent cliver les Intégrines, la Taline ou la FilamineA et permettre la dynamique des adhésions, notamment (Franco and Huttenlocher 2005).

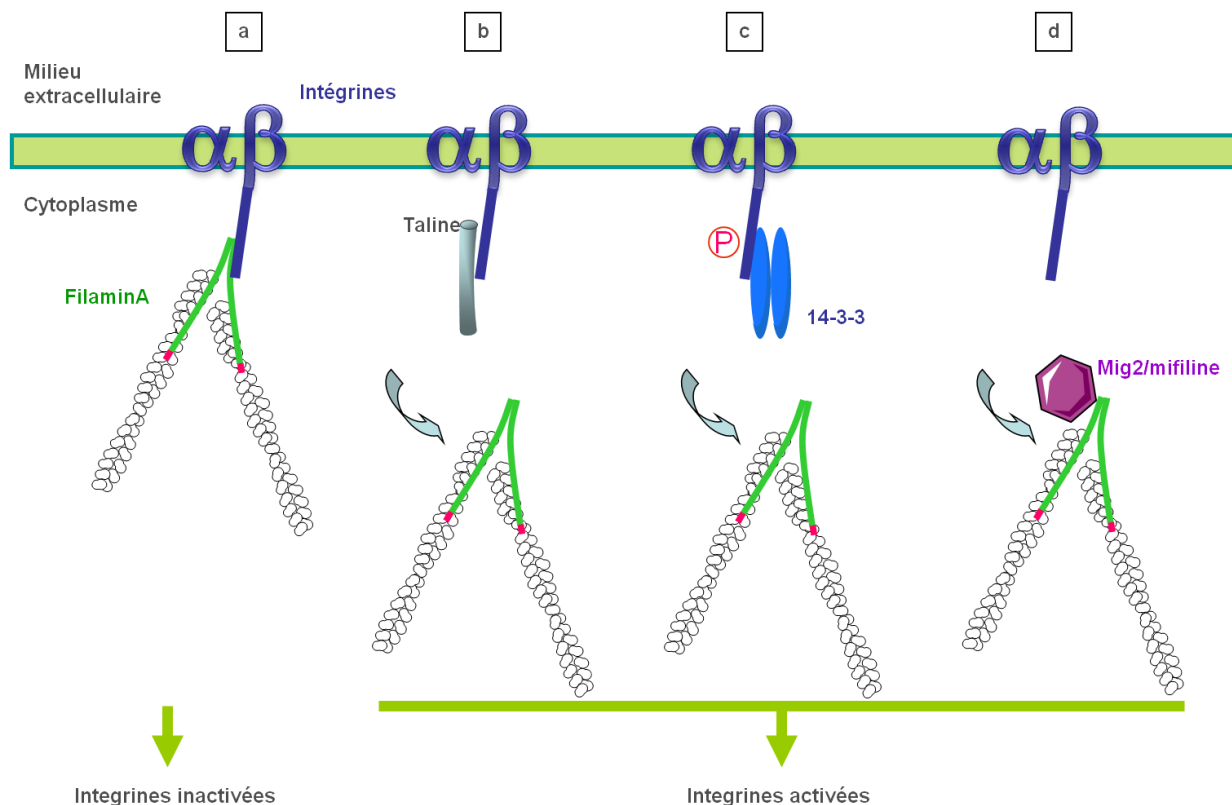


Figure 18: Représentation schématique de l'activation des Intégrines et de la régulation par la FilamineA.

L'état d'activation des Intégrines dépend du ligand présent sur la queue cytoplasmique de sa sous unité β . La liaison de la FilamineA bloque l'activation des Intégrines (a). L'interaction de la Taline (b) ou de la 14-3-3 après phosphorylation (c) induit la perte de l'interaction de la FilamineA, s'ensuit l'activation des Intégrines. La liaison du complexe mig2/Migfiline sur la FilamineA empêche la formation du complexe Intégrine-FilamineA et active également les Intégrines (d).

Il existe également d'autres domaines partagés entre plusieurs ligands tel que le domaine 19 où interagissent les récepteurs à la dopamine D2 et D3 (Lin, Karpa et al. 2001), l'Intégrine $\beta 7$ (Kiema, Lad et al. 2006) et GPIIb α (Nakamura, Pudas et al. 2006). Ces interactants ont des séquences homologues d'interaction à la FilamineA et il existe également une compétition d'interaction pour les liaisons à ce domaine (Nakamura, Pudas et al. 2006).

B.1.4.6 Conclusion sur les interactions de la FilamineA

Au final, nous avons vu que les interactions sur la FilamineA sont régulées par son organisation tertiaire particulière (autoinhibition, notamment), ses nombreux ligands et leur regroupement. L'environnement extrêmement dynamique pour les interactions avec sa région C-terminale et ses diverses localisations font donc de la FilamineA une protéine complexe. Nous verrons dans la partie suivante que cette complexité existe aussi dans sa fonction qui reste à ce jour encore difficile à déterminer.

B.1.5 Les fonctions de la FilamineA

Le rôle physiologique précis de la FilamineA reste à ce jour obscur. Afin de comprendre la fonction de la FilamineA, les syndromes liés à des mutations génétiques ont été étudiés et les modèles murins transgéniques pour la FilamineA ont complété ces données, permettant de déterminer son implication dans les contacts cellulaires et la migration cellulaire.

B.1.5.1 Approche fonctionnelle par l'analyse des syndromes liés à des mutations génétiques de la FilamineA chez l'Homme

Plusieurs mutations sur le gène de la FilamineA sont associées à des syndromes humains caractérisés par des défauts développementaux (Tableau VII). Des mutations ponctuelles « faux-sens » et « gain de fonction » entraînent des défauts de développement squelettique et cardio-vasculaire (Cunningham et al., 1992; Eksioglu et al., 1996; Feng et al., 2006; Fox et al., 1998; Nagano et al., 2004; Sheen et al., 2002). Parmi eux, on retrouve les malformations otopalatodigitales de type 1 et 2 (otopalatodigital syndrome, OPD1 et OPD2), la dysplasie frontométaphyséale (frontometaphyseal dysplasia, FMD) et le syndrome de Melnick Needles (Melnick Needles syndrome, MNS), tous regroupés dans la littérature sous le terme « OPD ». Il existe aussi des syndromes liés à des défauts de développement cardiaque tels que la dystrophie valvulaire (X-linked myxomatous valvular dystrophy, XMVD) et un variant du syndrome Ehlers-Danlos (Variant Ehlers-Danlos) associé en plus à des défauts neurologiques.

Le syndrome majeur lié à des mutations sur le gène de la FilamineA est l'hétérotopie périventriculaire (HP). Dans ce cas, la plupart des patients produisent une protéine tronquée, confirmant que la perte de fonction de la FilamineA est la cause majeure de ce syndrome (Parrini, Ramazzotti et al. 2006). Ce syndrome lié au chromosome X révèle que la FilamineA est essentielle pour le développement car il est associé à une létalité à l'état embryonnaire chez les mâles hémizygotes, induisant des déformations cardiaques et des ruptures de vaisseaux sanguins, certainement liées à de sévères défauts de migration des cellules embryonnaires (Eksioglu, Scheffer et al. 1996; Fox and Walsh 1999; Ferland, Batiz et al. 2009). Les femmes hétérozygotes pour l'allèle muté présentent des crises épileptiques causées par l'accumulation de nodules de neurones embryonnaires dans les régions sous ventriculaires appelées hétérotopies périventriculaires. Ces femmes présentent également d'autres anomalies neuronales et des anomalies extraneuronales, notamment des problèmes cardiaques et vasculaires tels que la persistance du canal artériel, un axe de circulation sanguine fœtale qui existe physiologiquement uniquement chez le fœtus (Eksioglu, Scheffer et al. 1996; Huttenlocher, Palecek et al. 1997; Fox, Lamperti et al. 1998; Feng, Chen et al. 2006; de Wit, de Coe et al. 2010).

Historiquement, l'observation de nodules de neurones hétérotopiques (Fox and Walsh 1999) ainsi que l'expression importante de la FilamineA dans les neurones du cortex en développement et sa forte diminution chez l'adulte (Fox, Lamperti et al. 1998) ont logiquement impliqué la FilamineA dans la migration des progéniteurs neuronaux de la zone sous-ventriculaire (subventricular zone, SVZ) vers les régions corticales.

Cependant, des études récentes sur les cerveaux de patients atteints de HP et des modèles de souris n'exprimant plus de FilamineA ont montré une migration normale des progéniteurs neuronaux et des neurones adultes. Ces travaux ont par contre mis en évidence des défauts dans l'organisation de l'épithélium qui borde les ventricules latéraux, caractérisés entre autre par des défauts dans l'organisation des jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales épendymaires (Ferland, Batiz et al. 2009). Ces travaux mettent en lumière une fonction pour la Filamine dans l'organisation des contacts cellules-cellules. On peut dès lors envisager que la formation de nodules de cellules neuronales dans les régions sous-ventriculaires soit une conséquence des modifications de l'épithélium peri-ventriculaire.

Il faut aussi noter que la diversité et la complexité des syndromes humains associés aux mutations sur le gène de la FilamineA suggèrent que la protéine est probablement impliquée dans des régulations et fonctions cellulaires très diversifiées.

Mutations	Syndromes	Phénotype	Références
mutations faux-sens sur les domaines 3, 10, 14 et 15 et CH2	« OPD » : OPD1/2, FMD, MNS	dysplasies des structures cranio-faciales, des doigts et des os longs	(Robertson, Twigg et al. 2003; Clark, Sawyer et al. 2009)
	OPD1 - surtout chez les hommes	surdité, fente labiale, malformations crâniennes, dysplasie généralisées des os (scoliose, dislocation des genoux et hanches)	
	OPD2 - chez les hommes et les femmes	microcéphalie, retard mental plus sévère qu'OPD1	
	MNS - surtout chez les femmes	malformations du crâne et des structures cranio-faciales défauts des vertèbres, clavicules et os longs	
	FMD - surtout chez les hommes, moins sévère chez les femmes	défauts osseux, surcroissance des os faciaux, décès périnatal chez l'homme (malformations cardiaques, trachéo-bronchiques et urologiques)	(Robertson 2005)
�pissages anormaux ou protéine tronquée, mutations ponctuelles sur CH1 et H1	HP	défauts de migration des neurones, microcéphalie, persistance du canal artériel	(Fox, Lamperti et al. 1998; Sheen, Dixon et al. 2001; Feng and Walsh 2004)
délétion génomique d'un fragment de 1944pb	XMVD	dystrophie cardiaque et malformations des valves (pas de phénotype PH, OPD, FMD ou MNS)	(Kyndt, Gueffet et al. 2007)
Mutation ou délétion d'un résidu	Variant Ehlers-Danlos	HP, dilatation aortique chez le jeune adulte, fragilité des tissus conjonctifs	(Sheen, Jansen et al. 2005)

Tableau VII: Récapitulatif des syndromes liés à des mutations sur le gène de la FilamineA et leurs impacts sur le développement.

B.1.5.2 Approche fonctionnelle par l'analyse de modèles murins invalidés pour la FilamineA

Chez la souris, l'expression de la FilamineA est maximale pendant la période de développement embryonnaire. Dans cette période, elle est exprimée préférentiellement dans les vaisseaux intersomitiques   E 9,5-10,5 et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins à E 12.5 (Feng, Chen et al. 2006). On la retrouve dans les cellules de l'endothélium et mésenchymales cardiaques à partir d'E9,5 et son niveau chute en période post-natale après 6 mois (Norris, Moreno-Rodriguez et al. 2010). Plus spécifiquement, l'expression de la FilamineA au niveau du cœur de la souris est localisée dans des

structures ayant subi une TEM (cellules de la crête neurale, endothélium, épithélium de l'épicaarde) (Norris, Moreno-Rodriguez et al. 2010).

Dans le système nerveux central, la FilamineA est exprimée lors des périodes de développement cortical (E12,5 – 16,5) puis son expression chute chez l'adulte où on la retrouve en quantité grandement réduite (Fox, Lamperti et al. 1998; Sheen, Feng et al. 2002). A l'échelle cellulaire, on retrouve la FilamineA dans les neurites et cônes de croissance des neurones en migration et neurones post-migratoires ainsi que dans les cellules gliales (Fox, Lamperti et al. 1998; Sarkisian, Bartley et al. 2008). En culture *in vitro*, l'expression de la FilamineA est plus importante dans les précurseurs neuronaux que dans des neurones différenciés (Sheen, Feng et al. 2002).

Pour comprendre l'implication de la FilamineA dans le développement, en 2006 deux laboratoires ont généré des souris n'exprimant plus de FilamineA. La première, la souris « Dilp2 », est issue d'une mutation faux-sens par injection de *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) (Hart, Morgan et al. 2006) et la deuxième a été obtenue par mutagenèse et technique de Cre-lox en tronquant la protéine au 121^{ème} acide aminé (Feng, Chen et al. 2006). Bien qu'obtenues de façon indépendantes et par des méthodes distinctes, les phénotypes sont cohérents avec ceux des syndromes humains où la perte d'expression de la FilamineA conduit à une létalité embryonnaire (à environ E 14,5 et E 15,5) suite à des défauts sévères du développement cardio-vasculaire et osseux (Feng, Chen et al. 2006; Hart, Morgan et al. 2006; Zhou, Boren et al. 2007). Etonnamment, les deux modèles de souris dépourvues de FilamineA ne présentent pas d'HP (Feng, Chen et al. 2006; Hart, Morgan et al. 2006).

Pour comprendre ces phénotypes et pour pallier la létalité embryonnaire, Feng et al. ont généré des souris invalidées pour la FilamineA de façon conditionnelle dans les cellules de la crête neurale. Les souris décèdent d'hypoxie à P1 et présentent les mêmes défauts que les souris invalidées totalement, avec des défauts cardiaques et une désorganisation des cellules vasculaires endothéliales due à une diminution voire une absence d'expression de la VE cadhérine au niveau des jonctions adhérentes (Feng, Chen et al. 2006).

Ces trois modèles murins ont permis de confirmer le rôle essentiel de la FilamineA dans les interactions cellulaires et l'organisation des tissus. Ils n'ont pas permis de confirmer une implication directe de la FilamineA dans la migration neuronale.

B.1.6 Le rôle contradictoire de la FilamineA dans la migration

Plusieurs laboratoires ont aussi développé des études cellulaires afin d'évaluer l'implication de la FilamineA dans les dynamiques de migration cellulaire. Des résultats contradictoires ont été publiés qui ne permettent pas de conclure quant à la fonction de la Filamine.

B.1.6.1 La FilamineA favorise la migration

L'implication de la FilamineA dans les phénomènes migratoires a tout d'abord émergé des observations de défauts de locomotion des cellules M2 issues de mélanomes humains dépourvues de FilamineA, phénotype restauré après sa réexpression (Cunningham, Gorlin et al. 1992). Les cellules M2 présentent également un défaut de polarisation et une absence de fibres de stress (Cunningham, Gorlin et al. 1992) impliquant la FilamineA dans l'organisation du cytosquelette d'actine au sein de mécanismes liés à la migration.

Son rôle dans la migration neuronale est mis en évidence par l'étude du phénotype de l'HP et lorsque l'on considère que FILIP, qui régule le niveau de FilamineA, contrôle la migration neuronale (Nagano, Yoneda et al. 2002; Nagano, Morikubo et al. 2004). Aussi, la transfection *in utero* d'un plasmide dominant négatif pour la FilamineA dépourvu d'ABD (FilaminA Δ ABD) montre que des nodules se forment le long des ventricules dans des cellules qui, dans des conditions normales, migrent dans le parenchyme cérébral (Ferland, Batiz et al. 2009).

B.1.6.2 La FilamineA inhibe la migration

L'absence de la FilamineA a donc un impact négatif sur la migration mais il semble que des conditions de surexpression inhibent également la motilité cellulaire.

Cette idée a d'abord émergé de l'observation de patients masculins atteints d'une forme sévère d'HP (syndrome normalement observable uniquement chez les femmes car létal à l'état embryonnaire en l'absence d'un chromosome X portant un allèle sain), qui présentaient une duplication du gène de la FilamineA (Fink, Dobyns et al. 1997). De plus, la surexpression de la FilamineA dans les cellules M2 bloque la migration (Cunningham, Gorlin et al. 1992) et la surexpression *in situ* dans les neurones corticaux de souris la retarde (Sarkisian, Bartley et al. 2006). Egalement, les souris déficientes pour la protéine MEKK4, protéine responsable de la dégradation de la FilamineA, présentent des HPs et les neurones des nodules n'expriment plus de MEKK4 mais en revanche surexpriment les FilamineA et FilamineB (Sarkisian, Bartley et al. 2006).

Au final, il pourrait exister un lien entre la FilamineA et la migration mais la compréhension du mécanisme demeure obscure. La concentration et la localisation de la FilamineA doit être régulée en

fonction des conditions cellulaires, des partenaires protéiques (à ce jour non identifiés) doivent être requis pour ces phénomènes.

B.1.7 La FilamineA et les jonctions cellulaires

Nous avons vu que chez les patients atteints d'HP, la couche de cellules neuro-épendymaires est altérée. La perte de la FilamineA dans les autres syndromes humains induit des défauts de contacts cellules-cellules, tels des ruptures aortiques, des défauts de motilité intestinale et une augmentation de l'élasticité de la peau (voir tableau VII). Or, l'expression de la FilamineA se restreint aux pourtours des vaisseaux sanguins, intestin et peau, on peut donc imaginer que des défauts de structure de la paroi de ces organes soient en partie responsables de ces phénotypes (Fox, Lamperti et al. 1998; Sheen, Jansen et al. 2005; Ferland, Batiz et al. 2009).

Ceci est cohérent avec l'observation de la couche discontinue de cellules vasculaires chez la souris KO conditionnel. De plus, en culture *ex vivo*, l'expression de la β -caténine est diminuée au contact de cellules dominant-négatives pour la FilamineA et ces cellules présentent des défauts d'étalement et d'adhésion (Ferland, Batiz et al. 2009).

Au final, nous retiendrons l'implication probable de la FilamineA dans l'organisation des jonctions cellulaires et son implication indirecte dans les mécanismes préparant à la migration des neuroblastes.

Nous pensons que pour mieux appréhender les diverses fonctions de la Filamine, l'enjeu est maintenant de comprendre les différentes signalisations intracellulaires régulées par la FilamineA et son implication dans les régulations des dynamiques de l'actine. Dans ce contexte, nos travaux sur l'identification d'une nouvelle famille de protéines, les Refilines, qui se complexent à la FilamineA pour réorganiser des réseaux périnucléaires d'actine au cours de la transition épithéliale mésenchymateuse induite par le TGF- β (transforming growth factor-beta), et lors de la dissociation des cellules souches neurales de neurosphères en culture, ouvrent de nouvelles perspectives pour comprendre les fonctions des Filamines et certains syndromes associés aux mutations sur le gène *FilamineA*.

B.2 Les Refilines

Cette partie fait état des connaissances disponibles lors de l'initiation de l'étude sur la famille Refiline, en prenant en compte l'unique article qui traite de cette famille (Hirano, Murata et al. 2005) et les informations que nous avons obtenues par des analyses prédictives *in silico*.

B.2.1 Les gènes de la famille *FAM101* codent pour les Refilines

Les gènes paralogues FAM101A et FAM101B codent pour les protéines cfm2 et cfm1 (ou « cfm »), respectivement ; nous les avons renommées RefilineA et RefilineB (pour Regulator of Filamine) (Tableau VIII).

Les gènes FAM101A et FAM101B sont distincts et localisés sur des chromosomes différents (Tableau VIII). Du point de vue de l'évolution, ces 2 gènes apparaissent chez les poissons et résulteraient d'une duplication de gène.

Protéine (ancien nom)	Gènes	Localisation du gène chez l'humain	Localisation du gène chez le rat	Localisation du gène chez la souris
RefilineA (cfm2)	FAM101A	12	12	5
RefilineB (cfm1 ou cfm)	FAM101B	17	10	11

Tableau VIII: Les gènes FAM101A et FAM101B chez l'humain, le rat et la souris.

Depuis leur identification en 2002, suite au projet d'annotation de NCBI, différentes séquences codantes d'ADN ont été attribuées aux gènes FAM101A et FAM101B en considérant divers cadres de lectures ; ainsi étaient référencées des protéines d'environ 130 à environ 350 acides aminés. Au moment de l'unique étude des Refilines par Hirano et al., les bases de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) référençaient RefilineB de souris en tant que protéine de 345 acides aminés ; elle apparaît maintenant sous une forme de 216 acides aminés.

De la même façon, la forme humaine de RefilineA est actuellement présente sur le site de NCBI en tant que protéine de 135 acides aminés (NM_181709.4) alors qu'on retrouve à ce jour (avril 2011) cinq isoformes référencés sur la base de données Ensembl : ENSP00000315626, ENSP00000345898, ENSP00000374377, ENSP00000444080, ENSP00000444080 de 122 à 216 acides aminés. Pour nos études, nous nous concentrons sur les formes d'environ 200 acides aminés.

B.2.2 Etude des séquences et conservation des Refilines

Pour RefilineA comme pour RefilineB, chaque protéine est conservée entre les espèces avec environ 80% d'identité entre l'Homme et la souris ou le rat et 50% avec le poisson zèbre (selon <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

On peut identifier au sein de RefilineA et RefilineB, des séquences homologues à 100% entre les 2 protéines et chez les différentes espèces, dont une d'environ 15 acides aminés en partie N-terminales (région 26-40 et 21-37 pour RefilineA et RefilineB, respectivement) (Figure 19). Nous verrons dans la partie « Résultats » que cette région régule la stabilité des protéines.

RefilineA et RefilineB de rat présentent 40% d'identité et 48% de similitude. Aussi, RefilineB possède une séquence « RefilineB-spécifique » absente de RefilineA, dans sa région 40-66 (Figure 19).

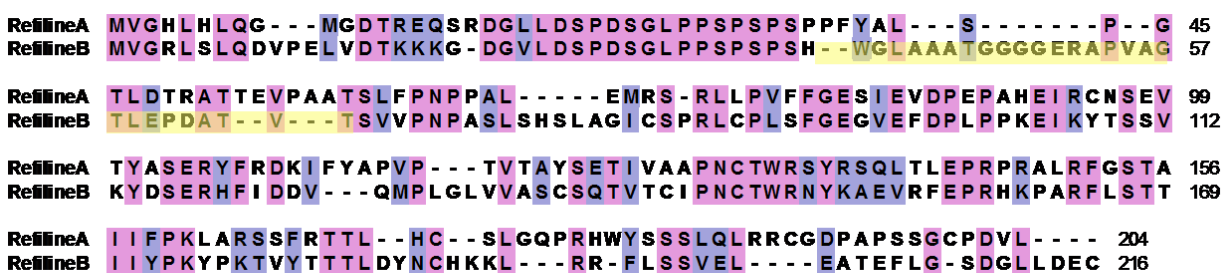


Figure 19: Alignement de séquence des protéines RefilineA et RefilineB de rat.

Les 2 protéines sont très conservées avec des séquences homologues (violet), similaires (bleu). On retrouve cependant une séquence spécifique de RefilineB absente de RefilineA (jaune).

B.2.3 Expression des Refilines

B.2.3.1 Expression dans les bases de données

L'expression de RefilineA et RefilineB dans les organismes murins ou humains est observable sur des sites de transcriptomes répertoriés dans le tableau IX ci-après.

Site	Tissu, espèce	RefilineA	RefilineB
http://biogps.gnf.org/	Différents organes de souris	Ostéoblastes	Placenta Système digestif Ostéoblastes
http://amazonia.transcriptome.eu/	Humain	Ganglion spinal Ganglion trigéminal Estomac Intestin grêle	iPS (cellules souches pluripotentes induites) Moëlle osseuse Fibroblastes
http://www.brain-map.org/	Cerveau adulte de souris	Bulbe olfactif	Cervelet Hippocampe Bulbe olfactif

Tableau IX: Récapitulatif des motifs de transcription gènes FAM101A et FAM101B et d'expression des protéines RefilineA et RefilineB chez l'humain et la souris à partir de bases de données.

B.2.3.2 Expression par hybridation *in situ* dans l'étude de Hirano et al.

En 2004, dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la régionalisation du neur ectoderme antérieur, Hirano et al. ont généré des souris déplétées pour RefilineB (« cfm » dans la publication) mais n'ont observé aucun phénotype (Hirano, Murata et al. 2005). Des expériences d'hybridation *in situ* montrent que RefilineB est exprimée uniquement lors du développement précoce du proencéphale (cerveau antérieur) et mésencéphale (cerveau moyen) alors que RefilineA est absente de ces régions mais est présente dans le rhombencéphale (cerveau postérieur) à E 9 ainsi que dans les somites précoces et tardifs à partir de E 8.5.

Dans le reste de l'organisme, on retrouve les deux paralogues dans le muscle de la langue et les nerfs périphériques ; le gène codant pour RefilineA est également transcrit dans les nerfs optiques et dans les poumons alors que celui codant pour RefilineB l'est dans le tube digestif (Hirano, Murata et al. 2005).

B.2.4 Etude *in sillico* de la séquence protéique pour l'identification de domaines de régulation potentiels

Nous avons cherché à identifier des domaines particuliers sur les Refilines grâce aux serveurs libre-accès. Un grand nombre de résidus représente des sites potentiels de phosphorylation et un seul domaine protéique a été identifié (boîte TonB).

B.2.4.1 Sites potentiels de phosphorylation

L'analyse prédictive des sites potentiels de phosphorylation a été menée grâce au serveur « NetPhosK » (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) et révèle qu'il existe une multitude de sites potentiellement phosphorylables.

Lors de ma thèse, j'ai confirmé la phosphorylation des Refilines, les sites de phosphorylation et les kinases responsables de ces phosphorylations demandent maintenant à être identifiées.

B.2.4.2 Autre site reconnu : la boîte TonB

Grace à l'outil « Prosite » du serveur Expasy (<http://expasy.org/prosite/>), nous avons cherché à identifier de potentiels sites ou motifs déjà connus. Une boîte TonB («**TonB-dependent receptor proteins signature 1** ») a été observée en position 1-88 sur la RefilineA de rongeurs (Figure 20). On ne retrouve pas ce domaine sur RefilineA humaine ou sur RefilineB.

Cette séquence est présente uniquement chez les bactéries. Chez *E. Coli*, ce récepteur est ancré à la membrane et permet l'entrée de substrats, notamment des métaux, dans l'espace periplasmique

(Noinaj, Guillier et al.). De ce fait, il est fort probable que ce motif ne soit pas fonctionnel dans les cellules eucaryotes.

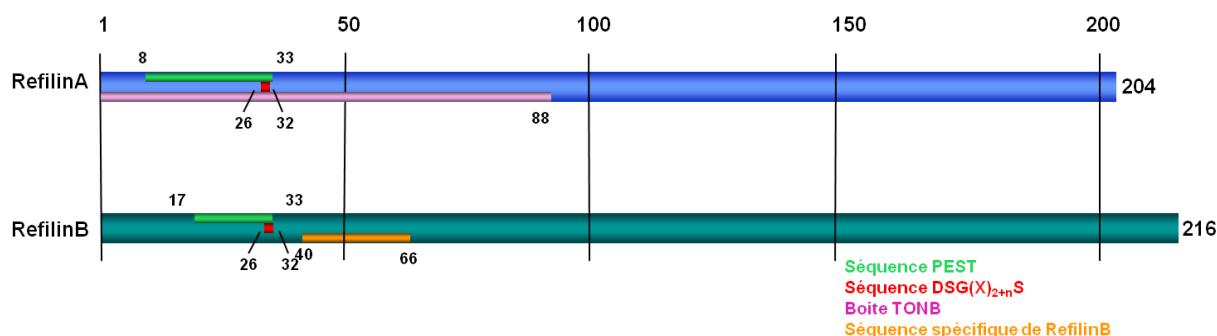


Figure 20: Représentation schématique des protéines RefilineA et RefilineB de rat.

Il existe une boîte TonB spécifique pour RefilineA (rose) et une séquence spécifique de RefilineB (orange). Les deux protéines possèdent des séquences PEST (vert) au sein desquelles il existe un motif de dégradation DSG(X)_{2+n}S (rouge).

B.2.4.3 Sites potentiels de dégradation des Refilines

Les Refilines présentent deux motifs associés à la dégradation rapide des protéines à durée de vie courte: la séquence PEST et le motif DSG(X)_{2+n}S. Ces deux motifs se chevauchent et sont situés dans la région N-terminale (Figure 20).

B.2.4.3.1 La séquence PEST

Les séquences PEST sont des régions hydrophiles de taille supérieure à 12 acides-aminés et contenant une proline (**P**), un acide glutamique ou aspartique (**E** ou **D**), une serine (**S**) ou thréonine (**T**) entourées de lysine (**K**), arginine (**R**) ou histidine (**H**) et dépourvues de résidus chargés positivement (Rechsteiner and Rogers 1996). Ce sont des séquences de dégradation, bien que le mécanisme spécifique de la dégradation soit à ce jour inconnu.

Le programme « pestfind », développé pour identifier de telles séquences (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::epestfind>), a révélé la présence d'une séquence PEST canonique sur les protéines RefilineA et RefilineB de rat (Tableau X).

Protéine	Score PEST	Position	Remarque
RefilineA humain	3.32		Pas de site PEST, pourtant site très conservé avec RefilineA de rat
RefilineB humain	10.17	17-33	même résultat que pour RefilineB rat (car séquence PEST conservée à 100%)
RefilineA rat	7.83	8-33	
RefilineB rat	10.17	17-33	

Tableau X: Les scores PEST des RefilineA et B chez l'homme et le rat.

Le programme pestfind attribue un score aux séquences protéiques. Un score supérieur à +5 reflète une potentielle séquences PEST.

B.2.4.3.2 Les motifs DSG(X)_{2+n}S : un signal de dégradation par le protéasome

Les Refilines présentent un motif DSG(X)_{2+n}S en région N-terminale qui se superpose partiellement à la séquence PEST. Ce motif est requis pour la reconnaissance des substrats devant être dégradés par le protéasome (Winston, Strack et al. 1999; Fuchs, Spiegelman et al. 2004).

Pour permettre sa reconnaissance, le substrat doit préalablement être phosphorylé sur les sérines au niveau du motif de destruction DSG(X)_{2+n}S (où n=0, 1 ou 2) (Winston, Strack et al. 1999; Fuchs, Spiegelman et al. 2004). Les motifs phosphorylés seront reconnus par la protéine β -TrCP (Beta-transducin repeats-containing proteins, également nommée FWD1), qui fait partie du complexe de la ligase SCF β -TrCP E3 qui participe à la dégradation par le protéasome (Winston, Strack et al. 1999). Les β -TrCPs sont des membres de la famille des Fbw (F-box/WD40 repeat containing) et il en existe deux isoformes chez les mammifères : β -TrCP1 et β -TrCP2 (Suzuki, Chiba et al. 2000).

Les motifs de destruction reconnus par β -TrCP au sein des protéines dégradées sont très similaires, en revanche leur phosphorylation requiert des kinases spécifiques pour chaque substrat (Suzuki, Chiba et al. 2000). Cette étape de modification post-traductionnelle des sérines regroupées dans ce motif de dégradation nécessite parfois l'intervention successive de plusieurs kinases soumises à une régulation par diverses signalisations. Par exemple, la β -caténine sera phosphorylée une première fois par la caséine kinase I (CKI) ce qui permettra la phosphorylation par la GSK3- β (Glycogen synthase kinase-3) sur les sérines du motif de destruction.

Parmi les protéines possédant un motif DSG(X)_{2+n}S on retrouve plusieurs protéines, facteur de transcription (Snail, ATF4) et protéines d'adhésion (β -caténine), participant à la signalisation TGF- β impliquée dans la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) (Tableau XI).

Substrat (humain)	Séquence DSG(X) _{2+n} S	Kinase	Fonction	Référence
β-Caténine (protéine adaptatrice et facteur de transcription)	DSGIHS	GSK3 + CK1	Sa dégradation inhibe l'induction de certains gènes	(Winston, Strack et al. 1999)
I-κBα (inhibiteur de NF-κB)	DSGLDS	IKK	Retient le facteur de transcription NF-κB dans le cytoplasme	(Winston, Strack et al. 1999) (Spencer, Jiang et al. 1999)
Snail (facteur de transcription)	DSGKGS	GSK3 + CK1	Empêche l'expression de l'E-cadhérine pour induire la TEM	(Yook, Li et al. 2005) (Zhou, Deng et al. 2004)
Emi1 – inhibiteur de APC (anaphase promoting complex)	DSGYSS	Cycline/Cdc2	La destruction d'Emi1 est critique pour la progression mitotique	(Margottin-Goguet, Hsu et al. 2003)
hDLG	DSGLPS	?	hDLG contribue au maintien des contacts cellule-cellule et est impliquée dans la régulation de l'adhésion et la prolifération	(Mantovani and Banks 2003)
ATF4 (Activator Transcription Factor 4)	DSGICMS	CK2	Régule la TEM dans les cellules de la crête neurale par la modulation d'expression de protéines des jonctions cellulaires	(Lassot, Segeral et al. 2001; Suzuki, Osumi et al. 2010)
Cdc25A (Tyrosine Phosphatase)	DSGFDLCS	?	Essentielle pour le cycle cellulaire, dégradée lors de dommages à l'ADN pour empêcher la progression du cycle	(Busino, Donzelli et al. 2003)

Tableau XI: Les protéines présentant des séquences DSG(X)_{2+n}S.

Snail est un facteur de transcription clé pour la mise en place des programmes de la TEM par répression de l'expression de l'E-cadhérine (Cano, Perez-Moreno et al. 2000). C'est une protéine instable à durée de vie estimée entre 25 minutes (Zhou, Deng et al. 2004) et 4 heures (Yook, Li et al. 2005).

Le facteur de transcription ATF4 est également un régulateur de la TEM. Lors de ce processus la protéine s'accumulera dans le noyau pour activer le programme de transition dans les cellules de la crête neurale chez l'oiseau (Suzuki, Osumi et al. 2010)

La β-caténine est une protéine d'adhésion qui joue un rôle dans l'ancrage du cytosquelette aux jonctions adhérentes, elle a aussi un rôle transcriptionnel lorsqu'elle est transloquée dans le noyau. Lorsqu'elle s'accumule dans le cytoplasme, la β-caténine est transloquée dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription Tcf/Lef pour induire la transcription de gènes, notamment les gènes mésenchymateux lors de la TEM.

Dans des conditions d'induction de la TEM, les motifs de dégradation de Snail, ATF4 et de la β -caténine seront déphosphorylés, s'ensuivra leur stabilisation pour permettre l'induction du programme de transcription de la TEM (Yook, Li et al. 2005; Su, Fu et al. 2008; Suzuki, Osumi et al. 2010).

Nous verrons dans la partie « Résultats » que les Refilines sont des protéines responsables de réorganisation du cytosquelette d'actine et que leur stabilité est régulée de façon complexe. Leur dégradation dépend des séquence PEST et du motif $DSG(X)_{2+n}S$, et la protéine RefilineB est stabilisée par la signalisation du TGF- β . Dans ce contexte, je dresserai dans le chapitre suivant l'état des connaissances disponibles sur les modifications du cytosquelette d'actine lors de la TEM.

C. Le cytosquelette d'actine et la transition épithélio-mésenchymateuse

Nous verrons dans la partie « Résultats » que la RefilineB est spécifiquement stabilisée dans les cellules épithéliales lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induite par le « transforming growth factor-beta » (TGF- β). Dans ces cellules, le complexe Refiline/FilamineA participe à l'organisation d'une nouvelle structure périnucléaire d'actine appelée coiffe d'actine. En préambule de la publication résumant ces travaux, je ferai une brève introduction sur la TEM et les rôles du cytosquelette d'actine dans ce processus cellulaire.

C.1.1 Définition de la transition épithélio-mésenchymateuse

Lorsque les cellules épithéliales se déplacent au sein ou au delà d'un tissu, elles perdent les caractéristiques épithéliales et acquièrent des propriétés de cellules mésenchymateuses; c'est le phénomène de transition (ou transdifférenciation) épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Hay 1995).

Lors de ce processus, les cellules épithéliales s'aplatissent, s'allongent et acquièrent des propriétés de type fibroblastique avec une perte des jonctions intercellulaires et un remodelage des adhésions cellule-matrice, des réorganisations massives du cytosquelette et une augmentation de la motilité (Figure 21) (Savagner 2001; Moustakas and Heldin 2008; Hill, Tremblay et al. 2009). Ce phénomène est associé à la perte transcriptionnelle de gènes épithéliaux tels que de la E-cadhérine et l'expression de marqueurs mésenchymaux tels que la vimentine ou fibronectine (Savagner 2001; Thiery and Sleeman 2006). Ces modifications transcriptionnelles sont contrôlées, entre autres par les familles des facteurs de transcriptions Snail, ZEB ou « basic helix-loop-helix » (bHLH) (Xu, Lamouille et al. 2009).

La résultante de la TEM est l'acquisition de propriétés migratoires, elle est essentielle lors du développement, pendant la gastrulation et la migration des cellules de la crête neurale, notamment ; il est proposé qu'un mécanisme semblable soit impliqué en conditions pathologiques au cours des phénomènes de fibrose et de progression des carcinomes (cancers développés à partir d'un tissu épithélial) sous la forme de métastases (Thiery and Sleeman 2006).

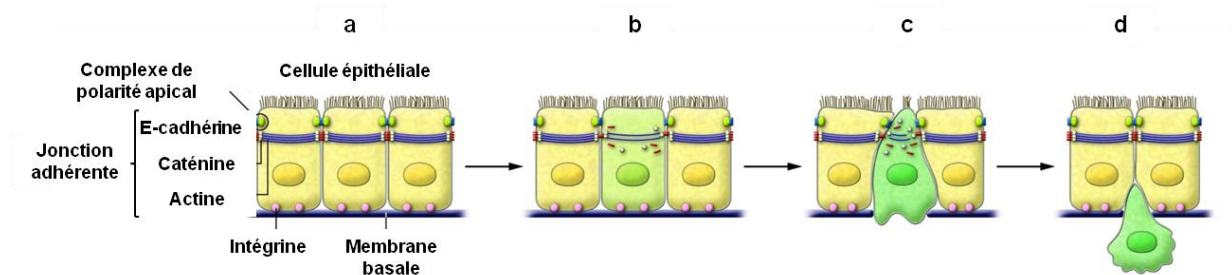


Figure 21: Les étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse.

a : Cellules épithéliales cohésives.

b : Diminution de l'expression des constituants des jonctions intercellulaires, perte de la polarité et expression de protéines mésenchymateuses.

c : Remodelages du cytosquelette et expression de protéines contractiles et de protéases de dégradation de la lame basale.

d : Acquisition d'un phénotype fibroblastoïde motile.

D'après (Acloque, Adams et al. 2009).

C.1.2 Modifications du cytosquelette lors de la transition épithélio-mésenchymateuse

Les cellules épithéliales s'organisent pour former un épithélium : tissu hautement organisé composé d'une monocouche de cellules connectées par des jonctions cellulaires et attachées à la membrane basale via des complexes protéiques (Figure 22). Elles sont capables d'adhérer à divers substrats et ce sont des cellules polarisées : les surfaces basale et apicale sont structurellement différentes et possèdent des fonctions distinctes (Zhang, Betson et al. 2005).

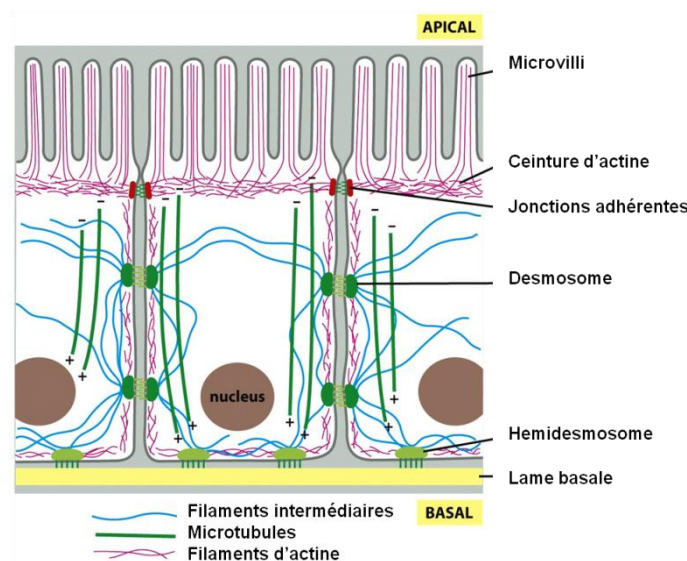


Figure 22: Représentation schématique de l'organisation du cytosquelette dans les cellules épithéliales polarisées.

Tous les composants du cytosquelette coopèrent pour remplir les fonctions cellulaires. On retrouve l'actine (rose) dans les microvillosités au niveau apical, dans la ceinture d'actine et au niveau cortical. Les filaments intermédiaires (bleu) se lient aux desmosomes et hémidesmosomes (jonctions intercellulaires et jonctions avec la matrice extracellulaire au niveau basal). Les microtubules (vert) sont organisés de façon verticale sous la membrane et permettent de localiser correctement les éléments de la cellule, entre autre le noyau.

D'après (Alberts, Wilson et al. 2008).

Il est à noter que les cellules mésenchymateuses et fibroblastiques sont des types cellulaires distincts. Les cellules mésenchymateuses proviennent de cellules épithéliales ayant subi une TEM et apparaissent au cours du développement embryonnaire bien que ces cellules persistent chez l'adulte (cellules souches mésenchymateuses) ; elles sont multipotentes (Zeisberg and Neilson 2009). Les cellules fibroblastiques, quant à elles, apparaissent plus tardivement lors du développement, ne sont pas issues d'une TEM et sont des cellules différenciées fortement spécialisées.

Cependant, en culture il est très difficile de les distinguer car expriment la vimentine et sécrètent de la fibronectine, des protéases et différents facteurs de croissance. Ainsi, dans le contexte de l'étude du cytosquelette, nous ne distinguerons pas les fibroblastes des cellules mésenchymateuses.

Lors de la TEM on observera une réorganisation générale du cytosquelette d'actine caractérisée par une disparition du réseau d'actine cortical et l'organisation de fibres de stress basales. Nous verrons que le complexe Refiline/Filamine contribue aussi à la formation d'une nouvelle structure d'actine perinucléaire au cours de la TEM.

Entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses, le cytosquelette d'actine présente de majeures différences, répertoriées ci-après (Tableau XII) :

	Cellules épithéliales	Cellules mésenchymateuses
Actine en câbles	- ceinture d'actine (« actin belt ») continue, constituée de câbles qui parcourent le tour de la cellule en région apicale, composée de Myosine II non-musculaire se liant aux cadhérines (Gates and Peifer 2005) - absence de fibres de stress dans les cellules cuboïdales polarisées (Zhang, Betson et al. 2005)	Fibres de stress ventrales, dorsales et des arcs organisés parallèlement entre eux, adhérant au substrat par des contacts focaux et créant des contacts intercellulaires par de fines protrusions (Yonemura, Itoh et al. 1995)
Actine en réseaux	Filaments sous-jacents à la membrane plasmique lâches interconnectés de façon orthogonale (Thiery and Sleeman 2006)	Au niveau des lamellipodes et en région corticale
Coiffe d'actine	Réseau réticulé (Khatau, Kim et al. 2010)	Réseau de fibres parallèles (Khatau, Hale et al. 2009)

Tableau XII: Différences d'organisation d'actine entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses.

C.1.2.1 Positionnement du noyau dans les cellules épithéliales par le complexe LINC

La Myosine joue un rôle primordial dans les cellules épithéliales où elle génère des faisceaux contractiles et est essentielle pour la stabilité des câbles d'actine périphériques et la maturation des cadhérines (Figure 23) (Ivanov, Bachar et al. 2007). Au cours de la TEM embryonnaire, la Myosine est requise pour le phénomène de constriction apicale où la contraction d'un réseau d'acto-myosine permet l'ingression de la cellule, c'est-à-dire le déplacement du contenu cellulaire en région basale pour permettre la migration hors de l'épithélium (Shook and Keller 2003) ; on retrouve ce processus lors du développement pendant la gastrulation ou la morphogénèse du tube neural (Vicente-Manzanares, Ma et al. 2009).

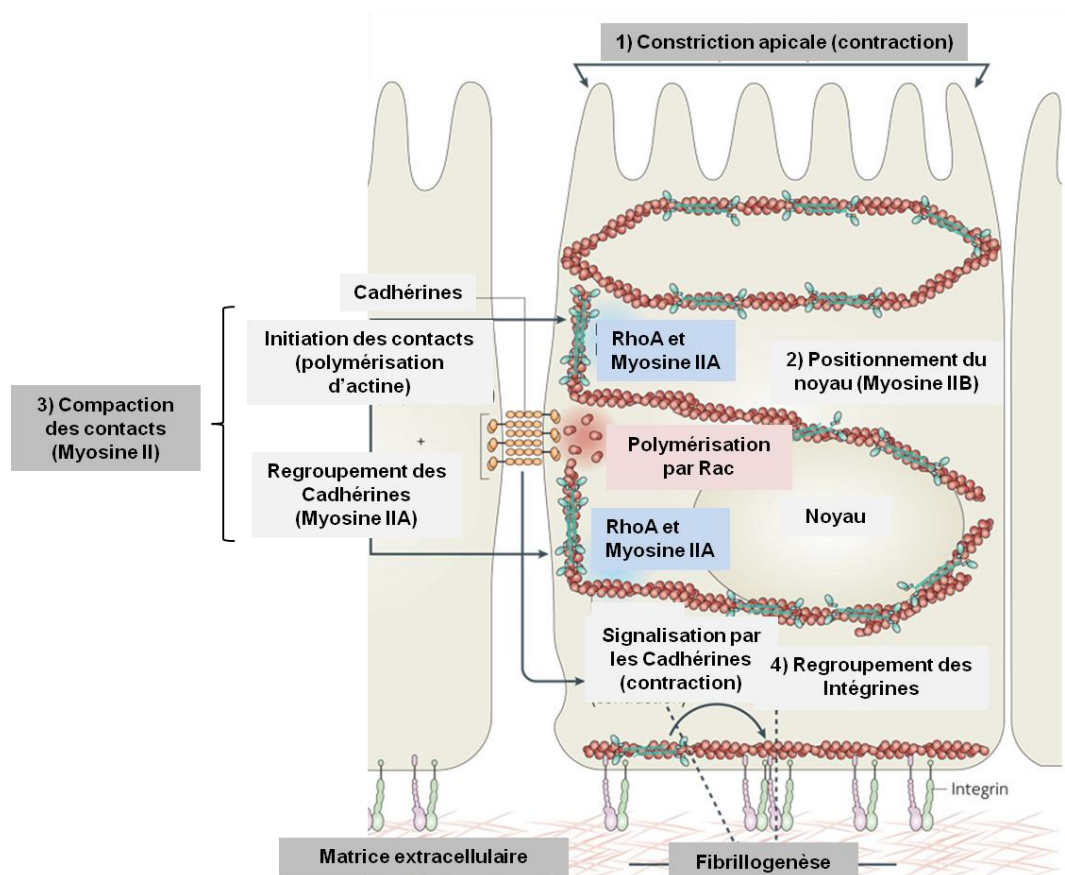


Figure 23: Représentation schématique de l'organisation et du rôle de la Myosine dans les cellules épithéliales.

Les différents rôles de la Myosine II non-musculaire. La Myosine II non-musculaire est impliquée dans 1) la constriction apicale, 2) le positionnement nucléaire, 3) le renforcement des contacts et le regroupement des cadhérines et 4) le remodelage de la matrice extracellulaire par activation des Intégrines et leur regroupement.

D'après (Vicente-Manzanares, Ma et al. 2009).

Récemment, une nouvelle protéine du complexe LINC spécifique de certains épithéliums, la Nesprine-4, a été identifiée dans les cellules épithéliales comme responsable du positionnement basal du noyau (Roux, Crisp et al. 2009). Elle est ancrée au noyau et se lie à la kinésine, moteur moléculaire antérograde, et glisse le long des câbles latéraux de microtubules en direction basale maintenant le noyau en position basale (Yonemura, Itoh et al. 1995; Roux, Crisp et al. 2009). Il existe donc un complexe LINC microtubule-dépendant spécifique des cellules épithéliales et il est possible que d'autres complexes existent dans ces cellules nécessitant le cytosquelette d'actine.

C.1.2.2 L'induction de la TEM par le TGF- β dans les cellules épithéliales NmuMGs

In vitro, le modèle des cellules épithéliales murines NmuMG (Non-transformed murine Mammary Gland) est couramment utilisé pour l'étude de la TEM induite par le TGF- β (Miettinen,

Ebner et al. 1994; Piek, Moustakas et al. 1999). Des traitements à court terme (24 à 48 h) induisent une TEM réversible ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire (Gal, Sjoblom et al. 2008).

En conditions de culture classique, les NmuMGs sont organisées en îlots compacts et présentent des jonctions bien organisées, un réseau d'actine cortical et quelques rares fibres de stress (Maeda, Johnson et al. 2005). En réponse au traitement TGF- β , les marquages E-cadhérine et ZO-1 deviennent fragmentés, signe du désassemblage des jonctions, alors que l'actine corticale se relocalise en fibres de stress dont l'extrémité est marquée par la paxilline, signe de formation des adhésions focales (Maeda, Johnson et al. 2005).

C.1.2.3 La signalisation TGF- β dans la TEM

La TEM peut être induite ou régulée par divers facteurs de croissance et de différenciation, notamment le TGF- β , FGF (fibroblast growth factor), HGF (hepatic growth factor) et PDGF (platelet derived growth factor) et les protéines Wnt et Notch (Xu, Lamouille et al. 2009) ou des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène (Savagner 2001).

Les membres de la superfamille des cytokines TGF- β sont sécrétés de façon ubiquitaire et agissent sur le développement embryonnaire, l'homéostasie des tissus adultes (reproduction, maintien des cellules différenciées) et la pathogenèse (fibroses, progression tumorale) (Piek, Moustakas et al. 1999). Le TGF- β se lie aux dimères de récepteurs au TGF- β et est capable d'induire à lui seul l'ensemble des changements morphologiques des cellules épithéliales mammaires lors de la TEM : on dit que c'est un « master regulator » de la TEM (Zavadil and Bottinger 2005; Wendt, Allington et al. 2009). Les TGF- β 1, - β 2 et - β 3 se lient tous aux mêmes types de complexes de récepteurs et possèdent des capacités similaires d'induction de la TEM *in vitro* (Miettinen, Ebner et al. 1994; Piek, Moustakas et al. 1999).

Le signal TGF- β permet l'activation d'une signalisation qui requiert principalement les facteurs de transcription de la famille des Smad, bien qu'il existe des signalisations alternatives (Derynck and Zhang 2003; Lamouille and Derynck 2007). Dans le noyau, les membres de la famille Smad jouent un rôle clé dans la transduction de signal intracellulaire, ceci permettra la modulation de transcription de nombreux gènes impliqués dans la TEM (Massague 2000; Derynck and Zhang 2003).

C.1.2.4 Formation de fibres de stress et modification des adhésions par le TGF- β

Lors de la TEM, le désassemblage local du cytosquelette d'actine sous-jacent à la membrane et sa réorganisation en fibres de stress ancrées aux adhésions focales induit la dissolution des jonctions

adhérentes et est concomitante à la formation de nouvelles adhésions focales (Maeda, Johnson et al. 2005).

Les jonctions adhérentes se désassemblent par décrochage de la E-cadhérine, s'ensuit la relocalisation de la β -caténine dans le cytoplasme. Celle-ci s'y accumule car sa dégradation par β -TrcP est empêchée dans le contexte de la TEM et est ensuite transloquée dans le noyau et participe à la signalisation de la TEM (Morin 1999; Su, Fu et al. 2008).

L'activation de la voie p38MAPK par le TGF- β induira le recrutement des Intégrines aux récepteurs au TGF- β et l'activation des FAKs (focal adhesion kinase), permettant ainsi la formation des adhésions focales et l'étalement cellulaire (Cicchini, Laudadio et al. 2008; Lehenbre, Yilmaz et al. 2008; Wendt, Allington et al. 2009).

La signalisation TGF- β permettra également, via l'activation de la LIM kinase (LIMK), l'inhibition du facteur de dépolymérisation cofiline et donc la formation de fibres de stress (Vardouli, Moustakas et al. 2005).

De tels changements morphologiques lors de l'activation de la voie du TGF- β s'expliquent également par la modulation de transcription de gènes. Un traitement prolongé au TGF- β (48h) active la voie Smad, conduisant à la formation de fibres de stress par la synthèse de protéines, notamment la tropomyosine et de l' α -actinine (Piek, Moustakas et al. 1999; Edlund, Landstrom et al. 2002; Bakin, Safina et al. 2004).

C.1.2.5 La signalisation TGF- β et l'implication des petites GTPases

Il existe lors de la TEM induite par le TGF- β , une régulation spatiale de RhoA. Au niveau basal de la cellule, RhoA sera activée ce qui permettra l'expression de la forme α de l'actine du muscle lisse (α -SMA) et la formation de fibres de stress via l'activation de ROCK (RhoA activated kinase) (Masszi, Di Ciano et al. 2003; Burridge and Wennerberg 2004; Pellegrin and Mellor 2007).

En revanche, au niveau des jonctions adhérentes il se formera un complexe composé de la protéine Par6 (partitioning-defective protein 6), du récepteur 1 au TGF- β et de l'ubiquitine ligase E3 Smurf1 ; ceci entraînera alors la dégradation localisée de RhoA pour permettre la dissolution des jonctions (Ozdamar, Bose et al. 2005).

Au final, la compréhension globale des réorganisations de l'actine reste à ce jour assez obscure. De plus, les études actuelles n'ont pour l'instant pas identifié de protéines organisatrices du cytosquelette exprimées lors de la TEM pour l'induction des changements d'organisation de l'actine.

RESULTATS

Résultats

Au laboratoire, les protéines Refilines ont été identifiées lors d'une étude comparative de l'expression des ARNm entre cellules progénitrices neurales multipotentes et engagées dans la voie de différenciation oligodendrogliale. L'ARNm de RefilineA est exprimé de façon transitoire lors de l'engagement de la différenciation.

Dans la première partie de mon travail de thèse (Article « RefilineB (FAM101B) targets FilaminA to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape »), j'ai entrepris les caractérisations moléculaire et fonctionnelle des protéines Refilines. J'ai mis en évidence l'interaction des Refilines avec la FilamineA et l'implication du complexe Refiline/Filamine dans l'organisation des structures périnucléaires d'actine dans les fibroblastes et au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Dans la deuxième partie de mon travail de recherche j'ai étudié les régulations et fonctions du complexe Refiline/FilamineA dans le contexte de la différenciation des cellules neurales.

D. La RefilineB et la FilamineA organisent un réseau d'actine périnucléaire et régulent la forme du noyau

D.1 Résumé de l'article

Le cytosquelette d'actine est une structure dynamique impliquée dans les propriétés et fonctions cellulaires aussi diverses que l'adhésion, la migration, la division, la différenciation. Ces activités multiples mobilisent différentes organisations et dynamiques des fibres d'actine qui dépendent de protéines régulatrices spécifiques. J'ai identifié une nouvelle famille de protéines régulatrices du cytosquelette d'actine, les protéines Refilines (RefilineA et RefilineB), dont l'expression est strictement corrélée avec l'engagement des cellules dans des programmes de différenciation. La RefilineA est induite au cours de la transition des précurseurs neuraux multipotents en cellules progénitrices gliales. La RefilineB est stabilisée dans les cellules épithéliales lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induite par le TGF- β . Dans ces cellules, les Refilines agissent en se complexant à la FilamineA.

La FilamineA est une protéine de liaison à l'actine qui lie les microfilaments pour stabiliser leur maillage. Les protéines Refilines interagissent avec la FilamineA, cette dernière organise alors préférentiellement l'actine en câbles plutôt qu'en mailles. Les câbles d'actine induits par le complexe Refiline/FilamineA participent alors à l'organisation d'une nouvelle structure d'actine périnucléaire appelée coiffe d'actine. Sur la base de ces observations, j'ai ensuite identifié pour la première fois un processus biologique associé à la formation de câbles d'actine périnucléaire, la TEM induite par le TGF- β . Au cours de la TEM, le cytosquelette d'actine corticale des cellules épithéliales se réorganise en fibres de stress basales. J'ai montré que dans ces cellules, le complexe Refiline/FilamineA est spécifiquement associé à la formation d'une nouvelle organisation de l'actine sous la forme des câbles périnucléaires qui s'ancrent à la surface de l'enveloppe nucléaire pour réguler les mouvements du noyau et l'adhésion. Les Refilines sont les seules protéines identifiées à ce jour capables de catalyser spécifiquement la formation de câbles d'actine périnucléaires *in vivo*. Ces résultats ouvrent donc de nouvelles perspectives pour appréhender la biologie et les fonctions des caps d'actine. La démonstration d'une implication de la FilamineA dans la formation des câbles d'actine périnucléaires au cours de la TEM devrait permettre de comprendre les fonctions de la FilamineA au cours du développement et les syndromes humains associés aux mutations du gène *FilamineA*.

D.2 Introduction

J'ai identifié une nouvelle famille de protéines, les Refilines (RefilineA et RefilineB), qui se lie à la protéine FilamineA de liaison au cytosquelette d'actine pour organiser une structure périnucléaire d'actine. Ce phénomène a lieu lors de la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) induite par le TGF- β , transition au cours de laquelle ont lieu de nombreux changements d'organisation du cytosquelette d'actine.

J'ai donc étudié l'implication biologique de cette structure ainsi que le rôle du complexe Refiline/FilamineA dans le contexte de la TEM.

D.3 Publication “RefilineB (FAM101B) targets FilaminA to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape”

RefilinB (FAM101B) targets FilaminA to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape

Olivia Gay^{a,b,c,1}, Benoît Gilquin^{a,b,c,1}, Fumihiko Nakamura^d, Zandra A. Jenkins^e, Rosannah McCartney^e, Deborah Krakow^f, Alexandre Deshiere^{a,b,c}, Nicole Assard^{a,b,c}, John H. Hartwig^d, Stephen P. Robertson^e, and Jacques Baudier^{a,b,c,2}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 873, F-38054 Grenoble, France; ^bCommissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire Transduction du Signal, Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant, F-38054 Grenoble, France; ^cUniversité Joseph Fourier, F-38054 Grenoble, France; ^dTranslational Medicine Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115; ^eDepartment of Women's and Children's Health, Dunedin School of Medicine, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand; and ^fMedical Genetics Institute, Cedars-Sinai Medical Center and Departments of Orthopedic Surgery and Human Genetics, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA 90095

Edited by James A. Spudich, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, and approved June 2, 2011 (received for review March 18, 2011)

The intracellular localization and shape of the nucleus plays a central role in cellular and developmental processes. In fibroblasts, nuclear movement and shape are controlled by a specific perinuclear actin network made of contractile actin filament bundles called transmembrane actin-associated nuclear (TAN) lines that form a structure called the actin cap. The identification of regulatory proteins associated with this specific actin cytoskeletal dynamic is a priority for understanding actin-based changes in nuclear shape and position in normal and pathological situations. Here, we first identify a unique family of actin regulators, the refilin proteins (RefilinA and RefilinB), that stabilize specifically perinuclear actin filament bundles. We next identify the actin-binding filamin A (FLNA) protein as the downstream effector of refilins. Refilins act as molecular switches to convert FLNA from an actin branching protein into one that bundles. In NIH 3T3 fibroblasts, the RefilinB/FLNA complex organizes the perinuclear actin filament bundles forming the actin cap. Finally, we demonstrate that in epithelial normal murine mammary gland (NmuMG) cells, the RefilinB/FLNA complex controls formation of a new perinuclear actin network that accompanies nuclear shape changes during the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Our studies open perspectives for further functional analyses of this unique actin-based network and shed light on FLNA function during development and in human syndromes associated with *FLNA* mutations.

cfm1 | cfm2 | neural progenitors

Physical connections between perinuclear actin bundles and the nuclear envelope are essential for nuclear movement that controls cell migration and mammalian developmental processes. Defects in perinuclear actin organization are associated with many disease states (1). In fibroblasts, cell shape, nuclear shape, and movement are controlled by specific perinuclear actin networks of actin cables anchored to the nuclear membrane, called transmembrane actin-associated nuclear (TAN) lines (2) or actin cap (3). Despite extensive work on cytoskeleton anchorage at the nuclear envelope, it remains to be determined how actin bundle dynamics are regulated at the nuclear surface. Here we identify a unique family of F-actin bundling proteins that we call refilin (RefilinA and RefilinB) (for REgulator of FILamin proteIN), which function to organize perinuclear actin networks in fibroblasts and in epithelial cells during epithelial-mesenchymal transition (EMT). Refilins bind to the actin-binding filamins. Filamins (FLNA, FLNB, and FLNC) are a family of actin binding and scaffolding proteins that integrate cellular architecture and signaling and are essential for normal fetal development (4–6). Mammalian FLNA is composed of an amino-terminal actin binding domain followed by 24 repeats of which the last repeat mediates dimerization. Two flexible hinge regions, H1 and H2, separate repeats 15 and 16 and 23 and 24, respectively (7). Dimerization of FLNA forms V-shaped molecules that cross-link

actin filaments into orthogonal networks (7). FLNA-null murine embryos die with severe vascular, cardiac, and brain morphogenic defects (8, 9). In humans, pathogenic mutations in *FLNA* cause a wide range of developmental malformations in the heart, skeleton, and brain (10–12). A comprehensive model of FLNA functions is still difficult to formulate and it remains unclear how different mutations in the same protein can cause such a broad spectrum of diseases. Here we provide evidence that refilin converts FLNA from an F-actin branching protein into an F-actin bundler and that the refilin/FLNA complex functions to organize an actin cap in fibroblasts and a unique perinuclear actin network in epithelial cells during EMT mediated by TGF- β . EMT is a biological process that plays crucial roles in the differentiation of multiple tissues and organs (13, 14). These findings open unique perspectives for understanding FLNA function during embryonic development and in human syndromes associated with *FLNA* mutations.

Results

Refilin Promotes Formation of Perinuclear Actin Bundles in Astrocytoma U373A Cells. Refilin proteins belong to the *FAM101* family of genes conserved in mammals (*FAM101A*–*RefilinA* and *FAM101B*–*RefilinB*) that are widely expressed during early embryonic development in the mouse (15). We identified refilins because their transcripts are up-regulated during cell differentiation switches. RefilinA mRNA is up-regulated during the commitment of multipotent neural precursor cells into glial progenitor cells. RefilinB mRNA is up-regulated during EMT mediated by TGF- β . Refilins are hydrophilic proteins and enriched in proline with a secondary structure predicted to be composed of β structures and coiled domains lacking α helices. Refilins are characterized by a conserved N-terminal sequence harboring a DSG (X)_{2–4}S motif that mediates degradation of short-lived proteins (16) and is also found in nuclear transcription factors involved in TGF- β -dependent EMT signaling (17).

To gain insight into the function of refilin proteins, we first compared the cellular localization of GFP and RefilinA/B–GFP fusion proteins in U373A cells that do not express endogenous

Author contributions: O.G., B.G., F.N., Z.A.J., A.D., S.P.R., and J.B. designed research; O.G., B.G., F.N., Z.A.J., A.D., J.H.H., and J.B. performed research; R.M., D.K., and N.A. contributed new reagents/analytic tools; O.G., B.G., F.N., Z.A.J., J.H.H., S.P.R., and J.B. analyzed data; and F.N., S.P.R., and J.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹O.G. and B.G. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. E-mail: jbaudier@cea.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1104211108/-DCSupplemental.

reflins (Figs. S14 and S2 and Movies S1 and S2). Reflin-GFP constructs localized along actin fibers and promoted formation of parallel actin filament bundles organized into a crescentic shell on top of the nucleus. The height of the nuclei was reduced in ReflinB-GFP-expressing cells that had perinuclear actin bundles compared with control cells (Fig. S1 A, xz and B). The perinuclear actin filaments were immunostained with myosin II antibody, indicating that they are contractile actin bundles (Fig. S1C). Cells with high expression of reflin-GFP are also characterized by star-shaped actin superstructures that are connected to the perinuclear actin bundles (Figs. S14, arrowheads and S2). Electron microscope observation revealed that these superstructures are enriched in F-actin from which actin stress fibers project (Fig. S3). Similar star-shaped actin superstructures are occasionally observed in NIH 3T3 cells expressing endogenous ReflinB (Fig. 4C, arrowhead).

Reflins Dimerize and Interact with Filamins. To understand the cellular mechanism through which reflins promote perinuclear actin bundles, we searched for partner proteins by yeast two-hybrid screening (*Materials and Methods*). Using a ReflinA bait encompassing residues 11–216 of the human protein, 400 interacting colonies were obtained (mating efficiency 6×10^6), 88% of which were identified as being nearly full-length ReflinA, strongly suggestive of a homodimerizing capability of this protein. Upon screening with a second truncated ReflinA bait comprising residues 66–216 (mating efficiency 5.3×10^6), no ReflinA interacting clones were found, indicating that the ReflinA homodimerizing domain resides within the N terminus of the protein. Of the 96 interacting clones in this experiment, 33 (34%) encoded sequences derived from the C-terminal region of FLNA, extending from repeat 15 to the C terminus of the protein. C-terminal domains of FLNB and FLNC were also identified as interactants. ReflinA dimerization was confirmed by yeast two-hybrid-directed matings (Fig. 1A) and the dimerization interface was similarly shown to be distinct from the FLNA interaction domain (Fig. 1A). The ability of ReflinA to homodimerize was confirmed by coimmunoprecipitation (co-IP) of expressed tagged proteins (Fig. 1B). A physical interaction between reflins and the full-length FLNA was also confirmed by coimmunoprecipitation of Myc-tagged ReflinA or ReflinB expressed in human astrocytoma U373 cells (Fig. 1C). Coomassie blue staining of the immunoprecipitates shows an abundant protein of ~280 kDa (Fig. 1C, blue panels, arrows). Mass spectroscopy sequence analysis of peptides derived from a trypsin digest of this 280-kDa protein revealed it to be a mixture of FLNA and FLNB. Western blot analysis with anti-FLNA-specific antibodies confirmed the identity of the 280-kDa protein as FLNA (Fig. 1C, black/white panels).

In U373A cells, the binding of ReflinB or ReflinA to FLNA promotes a relocalization of FLNA from diffuse cytoplasmic staining (in control cells expressing GFP) onto newly formed perinuclear parallel actin bundles and actin superstructures (Fig. 1D and E and Movies S3 and S4 and Fig. S2). The reflin/FLNA complex concentrated at the periphery of the actin superstructure but not at their center (Fig. S2 C and D). To confirm a strict cooperativity between reflins and FLNA for perinuclear parallel actin localization and stabilization, we expressed ReflinA in melanoma M2 cells that do not express detectable level of FLNA and in their A7 cells' counterpart that express FLNA through stable transfection of the FLNA gene (18). In M2 cells, perinuclear actin stress fibers are never observed and ReflinA expression does not stimulate their formation (Fig. S44). In A7 cells, ReflinA protein promotes formation of perinuclear parallel actin stress fibers (Fig. S44) and specifically relocalizes FLNA on perinuclear parallel actin stress fibers (Fig. S4B).

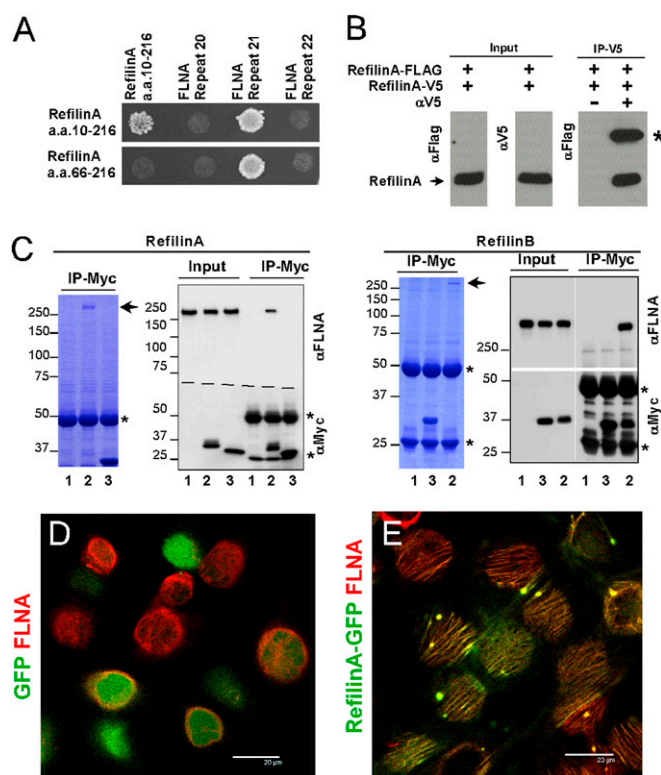


Fig. 1. Reflin targets FLNA in vivo. (A) Directed yeast two-hybrid mating of pGBAD-BD ReflinA (amino acids 11–216) and pGBAD-BD ReflinA (amino acids 66–216) with pACT2B ReflinA (amino acids 11–216), pACT2B FLNA repeat 21 and pACT2B FLNA repeat 20 and 22 used as negative controls. (B) HEK293 cells were cotransfected with ReflinA (amino acids 11–216)-FLAG and ReflinA-V5. Total cell extracts (input) and immunoprecipitates (IP-V5) were analyzed by Western blot using mouse anti-V5 and anti-FLAG antibodies. Asterisk indicates the heavy chain IgG of mouse anti-V5. (C) ReflinA (Left) or ReflinB (Right) coimmunoprecipitate with FLNA. Untransfected U373 MG cells (lane 1) or cells transfected with Myc-tagged ReflinA/B (lane 2) or control Myc-tagged protein corresponding to the 1–220 N-terminal amino acid sequence of ATAD3A protein (lane 3) were used for immunoprecipitation with anti-Myc antibodies. Total cell extracts (input) and immunoprecipitates (IP-Myc) were resolved on SDS/PAGE. Immunoprecipitates were analyzed by Coomassie blue staining. Arrows indicate the position of FLNA. Total cell extracts and immunoprecipitates were analyzed by Western blot using anti-Myc or anti-FLNA antibodies. Asterisk indicates the position of heavy and light IgG chains. (D and E) U373A cells, infected with recombinant adenovirus expressing GFP-control (D) or GFP-ReflinB (E) were fixed and immunostained with mouse anti-FLNA antibody (red). Merged confocal microscopy sections at the apical surface are shown. (Scale bar, 20 μ m.) See also Movies S3 and S4.

FilaminA Mediates Reflin-Dependent Actin Bundling. To determine the impact of reflins bound to FLNA on F-actin organization, G-actin was polymerized in the presence of Flag-FLNA or a Flag-FLNA/His-EGFP-reflin complex purified from insect sf9 cells (Fig. 2A). Results obtained with His-EGFP-ReflinA are presented and were reproduced with His-EGFP-ReflinB. Fluorescence microscopy of the samples after costaining F-actin with fluorescent phalloidin (Fig. 2B and C) and electron microscopy (Fig. 2D and E) revealed homogenous actin filament networks formed with FLNA in the absence of reflins (Fig. 2B and D), whereas large F-actin bundles formed in the Flag-FLNA/His-EGFP-reflin samples even at a low ratio of FLNA to actin (1:100) (Fig. 2C and E). Deletion of a short sequence within ReflinA that was subsequently shown to be critical to the function of the ReflinA/FLNA complex (BD₂ domain, see below) totally abrogated the bundling activity of the FLNA/ABD₂

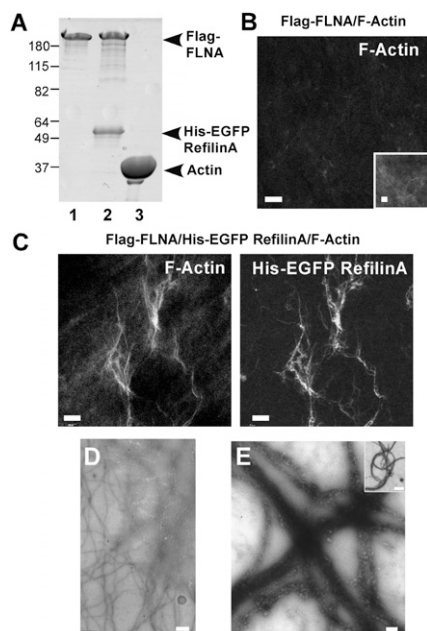


Fig. 2. RefilinA binding to FLNA promotes actin bundles in vitro. (A) Coomassie blue stain of 10% SDS/PAGE of purified Flag-FLNA (lane 1), Flag-FLNA/His-EGFP-RefilinA complex (lane 2), and actin (lane 3). (B and C) Actin (12 μ M) was mixed with 0.12 μ M of Flag-FLNA (B) or Flag-FLNA/His-EGFP-RefilinA complex (C), polymerized by the addition of 2 mM $MgCl_2$ and 0.1 M KCl in the presence of Alexa-Fluor 568 phalloidin. Polymerized actin was observed by confocal microscopy. Only Flag-FLNA/His-EGFP-RefilinA complex induces actin bundles. (Scale bar, 200 μ m.) (B, Inset) High magnification. (Scale bar, 2 μ m.) (D and E) Transmission electron microscopy of negatively stained actin filaments cross-linked by FLNA (D) or FLNA-RefilinA complex (E). (Scale bar, 0.2 μ m.) (Inset) Low magnification of bundles. (Scale bar, 1 μ m.) Specimens in D and E were diluted to 2 μ M F-actin and stained with 2% uranyl acetate.

RefilinB complex both in vitro and in cells (Fig. S5). Altogether, these results indicate that refiles function as molecular switches that convert FLNA from an actin branching protein into one that bundles actin into fibers.

Mechanism of Refilin-FLNA Interaction. Using N- and C-terminal deletion RefilinA mutants, the minimum RefilinA region required to interact with FLNA was mapped to residues 128–175 (Fig. 3A). Comparison of the 128–175 RefilinA sequence to other FLNA binding partners identified four potential FLNA binding domains (BD₁–BD₄) (Fig. 3A and Fig. S6). These domains were sequentially deleted from the full-length protein and the mutants (Δ BD₁– Δ BD₄) were studied, compared with wild-type RefilinA, for binding FLNA in U373 MG cells (Fig. 3B). The Δ BD₁ and Δ BD₃ deletion mutants coimmunoprecipitated with FLNA to the same extent as the wild-type protein (Fig. 3B, lanes 2, 3, and 5). FLNA binding by the Δ BD₂ and Δ BD₄ deletion mutants was maintained but dramatically decreased (Fig. 3B, lanes 4 and 6). These results suggest the presence of at least two noncontiguous regions of RefilinA that are necessary for binding to FLNA.

To map the refilin binding domains on FLNA, various yeast clones expressing FLNA truncated C-terminal constructs were mated to clones expressing RefilinA (residues 11–216) using the yeast two-hybrid vector system (Fig. 3C). Bait and prey vectors were reversed for these experiments relative to those used previously (Fig. 1A). Repeat 21 on FLNA was found to be critical for RefilinA binding. These results were confirmed by coimmunoprecipitation of RefilinA-Myc with different HA-tagged FLNA constructs coexpressed in M2 cells that lack endogenous

FLNA (Fig. S7A). To determine whether FLNA repeat 21 is the only refilin binding site we next compared binding of refiles to the full-length FLNA and Δ 21-FLNA mutant lacking repeat 21. Deletion of domain 21 was not sufficient to inhibit interaction of RefilinA or RefilinB with FLNA, as assessed by co-IP (Fig. 3D, lanes 3 and 5), suggesting that another refilin binding domain is present on FLNA. To identify this second refilin binding domain, we deleted additional domains on full-length FLNA protein (Fig. 3E). Sole deletion of domain 24 or 21 did not inhibit the interaction (Fig. 3E, lanes 3 and 4). However, if both domain 21 and domain 24 were deleted, the interaction of the Δ 21/ Δ 24-FLNA mutant with RefilinA was drastically reduced (Fig. 3E, lane 5). If domain 21 and adjacent domains 19 or 23 were then deleted while keeping the dimerization domain 24 intact, the interaction of these FLNA mutants with refilin was also drastically decreased (Fig. 3E, lanes 6 and 7). We conclude that repeat 21 provides a template for the interaction of refilin with FLNA monomer and that a second refilin binding domain, which requires FLNA dimerization, strengthens this interaction. This model is consistent with the presence of two putative FLNA binding domains on refilin and possible cooperative binding of refilin to FLNA.

We next asked whether refilin dimer promotes the formation of multimolecular FLNA complexes to bundle F-actin. To answer this question, we cotransfected a construct encoding only repeats 19–22 fused to HA tag (FLNA[19–22]-HA) with either a Myc tagged control protein, RefilinA-Myc or one of the RefilinA-Myc deletion mutants (Δ BD₁– Δ BD₄) in U373 cells. FLNA[19–22]-HA was immunoprecipitated and immunoprecipitates were analyzed by Western blot for their RefilinA and FLNA contents (Fig. 3F). Results showed that FLNA[19–22]-HA, which is unable to dimerize or to bind actin, can bind to endogenous FLNA only when coexpressed with wild-type RefilinA. Note that in this experiment, the truncated FLNA[19–22]-HA will be in competition with the endogenous full-length FLNA dimer for binding refilin. This explains the limited amount of refilin and FLNA recovered within the immunoprecipitates. It is also noteworthy that Δ BD₁ and Δ BD₃ refilin mutants complex with FLNA[19–22]-HA but could not coimmunoprecipitate endogenous FLNA, indicating that BD₁ and BD₃ domains are necessary to nucleate a functional refilin-FLNA complex. The capacity of RefilinA to dimerize FLNA was confirmed with repeats 18–23 of FLNA fused to V5 or FLAG tags (Fig. S7B).

Altogether, these results support a model where the RefilinA dimer may function as a zipper to promote formation of a multimolecular FLNA complex on F-actin and to convert FLNA from an actin branching protein into one that bundles actin into fibers (Fig. 3G).

RefilinB/FLNA Complex Stabilizes Perinuclear Actin Cap in NIH 3T3 Cells. The perinuclear actin cytoskeleton organization mediated by refilin in U373A cells resembles in many aspects the “perinuclear actin cap” previously described in mouse 3T3 fibroblasts (3). To investigate whether the refilin/FLNA complex contributes to actin cap formation in 3T3 fibroblasts, we first analyzed the protein expression in NIH 3T3 cells. Western blot analysis showed specific RefilinB expression that increased as cells in culture reached confluence (Fig. 4A). The level of expression of RefilinA was below the detection limit. The specificity of the RefilinB band was confirmed by its down-regulation in stably transfected NIH 3T3 cells with two different shRNAs targeted to RefilinB (Fig. 4D).

Double indirect immunofluorescence analyses on cells fixed with methanol showed heterogeneous RefilinB immunoreactivity among cells. Cells showing the highest RefilinB immunostaining also demonstrated apical FLNA staining (Fig. 4B and C). RefilinB immunoreactivity colocalized with FLNA on parallel perinuclear filamentous structures organized into a crescentic

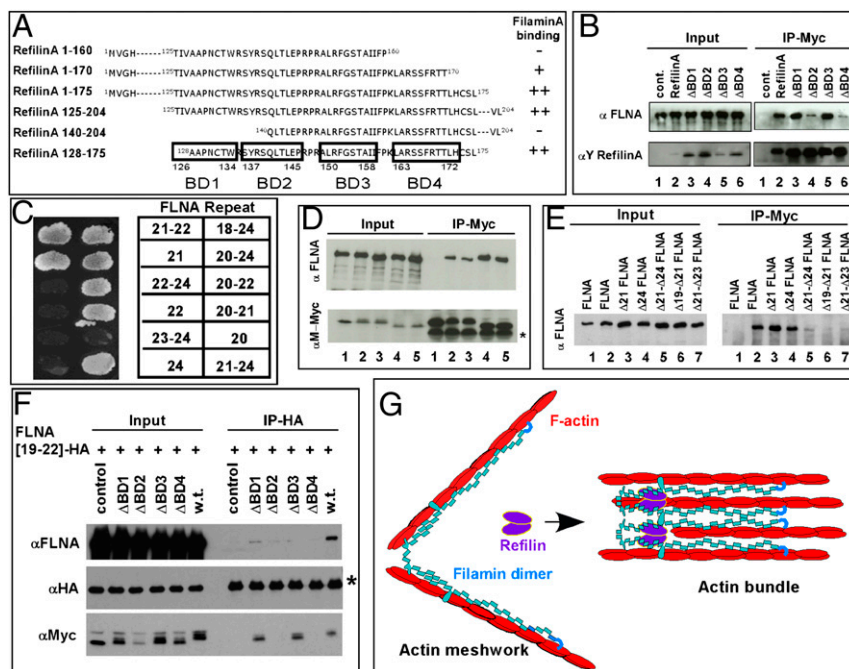


Fig. 3. Characterization of the RefilinA–FLNA interaction. (A) Sequences of C-terminal and N-terminal Myc-tagged RefilinA deletion mutants used to map the minimal domain required for interaction with FLNA. Interaction of various N-terminal and C-terminal RefilinA–Myc deletion mutants with endogenous FLNA was monitored by coimmunoprecipitation of the myc tag after transfection in U373 MG cells. Region 128–175 is involved in FLNA binding. Within this region, four putative binding domains were identified after sequence alignment with other FLNA binding proteins. The putative FLNA binding domains BD1–4 are boxed. (B) U373 MG cells were transfected with a control plasmid (lane 1) or recombinant plasmids expressing Myc-tagged wild-type RefilinA and RefilinA deletion mutants (Δ BD1–4) (lanes 2–6). Total cell extracts (input) and immunoprecipitates (IP-Myc) were analyzed by Western blot using mouse anti-FLNA and chicken anti-RefilinA antibodies. (C) Directed yeast two-hybrid mating of pACT2B RefilinA (amino acids 11–216) with truncated FLNA variants cloned into pGBAD-BD in yeast strain AH109. (D) M2 cells were cotransfected with either GFP-tagged FLNA (lanes 1, 2, and 4) or GFP-tagged Δ 21-FLNA mutant (lanes 3 and 5) and Myc-tagged control protein (lane 1), RefilinA–Myc (lanes 2 and 3) or RefilinB–Myc (lanes 4 and 5). (E) M2 cells were cotransfected with either Myc-tagged control protein (lane 1) or Myc-tagged RefilinA (lanes 2–9) and either GFP-tagged FLNA (lanes 1 and 2) or one of the following GFP-tagged FLNA mutants: Δ 21-FLNA (lane 3), Δ 24-FLNA (lane 4), Δ 21/ Δ 24-FLNA (lane 5), Δ 19/ Δ 21-FLNA (lane 6), and Δ 21/ Δ 23-FLNA (lane 7). Myc-tagged proteins were immunoprecipitated with mouse anti-Myc antibody. Total cell extracts (input) and immunoprecipitates (IP-Myc) were analyzed by Western blot using mouse anti-FLNA and mouse anti-Myc antibodies as indicated. (D) Asterisk indicates positions of IgG light chains. (F) U373MG cells were cotransfected with FLNA[19–22]-HA and Myc-tagged control protein, Δ BD1–4-RefilinA–Myc mutants or wild-type RefilinA–Myc as indicated. FLNA[19–22]-HA was immunoprecipitated with rat anti-HA antibody. Total cell extracts (input) and immunoprecipitates (IP-HA) were analyzed by Western blot using mouse anti-FLNA, mouse anti-HA, and mouse anti-Myc antibodies. Asterisk indicates positions of rat heavy IgG chains present in the immunoprecipitates that migrate just above FLNA[19–22]-HA construct and cross-react with the mouse secondary antibody used to reveal the Western blot. (G) Proposed schematic representation of RefilinA dimer as a molecular switch that converts FLNA from an actin branching protein into one that bundles. See text for details.

shell above the nucleus (Fig. 4C and Movie S5). With NIH 3T3 cells fixed with PFA and stained with phalloidin, we confirmed the specific localization of FLNA on parallel perinuclear actin bundles forming the actin cap (Fig. S8A). In NIH 3T3 cells stably transfected with shRNA targeted against RefilinB, perinuclear actin bundles that previously immunostained with RefilinB and FLNA in untransfected cells disappeared (Fig. 4E), and cells showed a disrupted cap organization (Fig. S8B). Cells with down-regulated RefilinB were also characterized by increased nuclear height (see reconstituted profile views in Fig. 4B and E and Fig. S8) and a more flattened nuclear morphology. To exclude possible off-target effects of RefilinB shRNA, we demonstrated that ectopic expression of RefilinA–Myc can sponsor actin cap formation in RefilinB null NIH 3T3 cells (Fig. S9). We conclude that the RefilinB/FLNA complex is a key regulator of actin cap dynamics in fibroblast cells.

RefilinB/FLNA Complex Mediates Organization of a Perinuclear Actin Network During EMT. In mouse epithelial NMuMG cells, RefilinB expression increases in response to TGF- β stimulation (Fig. 5A). The specificity of the RefilinB band was confirmed by its down-regulation in stably transfected NMuMG cell with RefilinB shRNA #5 (Fig. 5B). Here again, both RefilinA protein and mRNA were below the detection limit. In NMuMG cells stim-

ulated with TGF- β and fixed with methanol, RefilinB colocalized with FLNA exclusively on a new actin network that formed at the apical surface above the nuclei during early stages of the EMT process (Fig. 5C). In NMuMG cells fixed with PFA, staining with phalloidin and anti-FLNA antibodies confirmed the specific recruitment of FLNA on the new apical perinuclear actin network that forms during EMT (Fig. 5D and Movies S6–S8). In non-stimulated cells, F-actin organizes the cortical actin cytoskeleton and FLNA shows a diffuse cytoplasmic staining (Fig. 5D, control and Movie S6). Following TGF- β stimulation, a population of FLNA is specifically relocalized on perinuclear actin filament bundles that form at the apical surface (Fig. 5D, TGF- β 20 h and Movie S7). Later, in cells that have acquired fibroblastic morphology with elongated nuclei, FLNA immunoreactivity remains present on perinuclear actin bundles aligned with the overall nucleus-cell orientation (Fig. 5D, TGF- β 48 h and Movie S8). Remarkably, in those cells, FLNA immunoreactivity was excluded from basal actin stress fibers (Movies S7 and S8).

In the NMuMG cell line stably expressing RefilinB shRNA #5, down-regulation of RefilinB expression was associated with diffuse FLNA staining, disorganized apical actin network, and a delay in nuclear and cell shape remodeling in response to TGF- β stimulation (Fig. 5D, far Right column and Movie S9). Down-regulation of RefilinB had no impact on basal actin reorganization

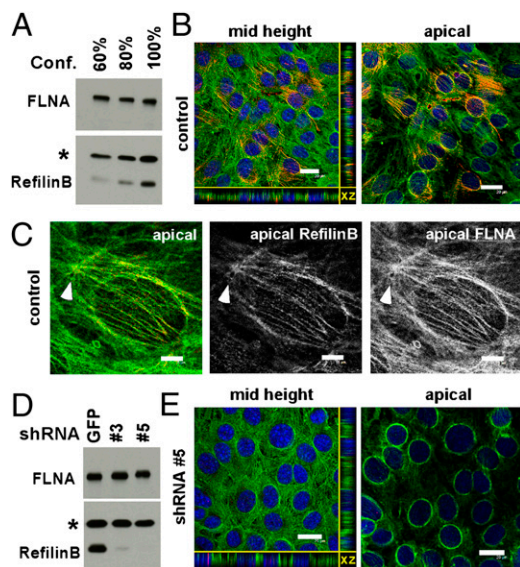


Fig. 4. RefilinB promotes the recruitment of FLNA on perinuclear actin cap in NIH 3T3 cells. (A) Western blot analysis for RefilinB and FLNA expression in NIH 3T3 cell extracts from exponentially growing cells (lane 1), cell reaching confluence (lane 2), and confluent cells (lane 3). Asterisk indicates position of a cross-reacting protein used as an internal loading control. (B and C) NIH 3T3 cells were fixed with methanol and double labeled with guinea pig RefilinB (red) and mouse FLNA (green) antibodies. Low (B) and high (C) magnification observations are shown. In C, merged and individual RefilinB and FLNA staining at the apical surface are shown. See also [Movie S5](#). Arrowhead points to superstructure (see text for detail). (D) Western blot analysis for RefilinB and FLNA expression in NIH 3T3 cells stably transfected with recombinant lentivirus expressing shRNA against GFP as a control (GFP) or two different shRNA against RefilinB (#3 and #5). (E) Stably transfected NIH 3T3 cells with recombinant lentivirus expressing RefilinB-shRNA #5 were fixed with methanol and double labeled with RefilinB (red) and FLNA (green) antibodies. (B and E, Left) Merged sections at the midheight and profile view (xz), nuclei are stained with Hoechst (blue). (Right) Merged staining at the apical surface. [Scale bars, 20 μ m (B and E); 5 μ m (C).]

([Movie S9](#)). Altogether, these results demonstrate a specific function of the RefilinB/FLNA complex in the regulation of a unique perinuclear actin network that forms during EMT and that contributes to nuclear cell-shape remodeling.

Discussion

Here we identify a unique actin regulatory family, refilins, which specifically promote actin filament bundles to organize apical perinuclear actin networks in mesenchymal cells. Refilins function through binding to the actin binding protein FLNA and conversion of FLNA from an F-actin branching protein into an F-actin bundler. Detailed analyses of the mechanisms of the refilin-FLNA interaction identified the presence of at least two FLNA binding domains on RefilinA (BD₂ and BD₄). Sequence comparison revealed conserved amino acids between RefilinA BD₂ and the FLNA binding domains on other proteins that bind to FLNA repeat 21 ([Fig. S6](#)). Specific activation of the actin bundling activity of FLNA by refilin could be mediated by additional contributions from the BD₄ domain within refilin to trigger conformational changes to the FLNA molecule. Determination of the structure of a three-domain fragment of human FLNA (repeats 19–21) revealed interactions between repeats that could function as an autoinhibitory mode of regulation of FLNA function (19). We propose that refilins, through binding to repeat 21 and possibly adjacent repeats, may reorganize the overall conformation of the FLNA 19–21 domain. This would, in turn, change the orientation of the FLNA rod

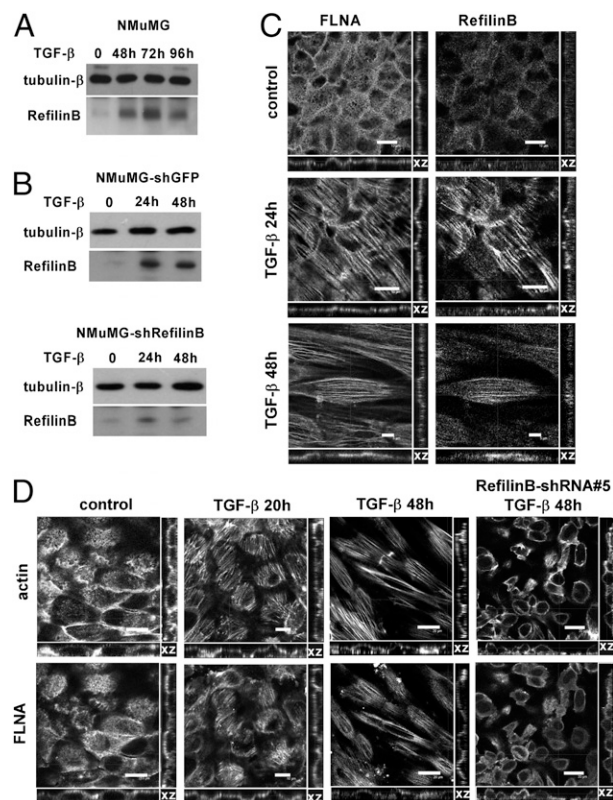


Fig. 5. FLNA relocates on actin cap in NMuMG cells during EMT. (A and B) Western blot analysis for RefilinB expression in NMuMG cells (A) and in stably transfected NMuMG cell lines with recombinant lentivirus expressing control shRNA (NMuMG-shGFP) (B, Upper) or shRNA #5 against RefilinB (NMuMG-shRefilinB) (B, Lower). Cells were stimulated with 2 ng/mL TGF- β for the indicated times. β -Tubulin was used as loading control. (C) RefilinB colocalizes with FLNA in NMuMG cells stimulated with TGF- β . NMuMG cells not stimulated (control) or stimulated with TGF- β for 24 h or 48 h were fixed with methanol and double labeled with mouse FLNA antibody and guinea pig RefilinB antibody. Reconstituted profile view (xz) and individual RefilinB and FLNA staining at the apical surface are shown. [Scale bar, 10 μ m (control and TGF- β 24 h) and 5 μ m (TGF- β 48 h).] (D) Stably transfected NMuMG cells with recombinant lentivirus expressing GFP-control shRNA or RefilinB-shRNA #5 (far Right column) were not stimulated (control) or stimulated with TGF- β for 20 h or 48 h (as indicated), fixed with PFA, and double labeled with Alexa 546-phalloidin and FLNA antibody. Individual FLNA and F-actin staining at the apical surface and reconstituted profile view (xz) are shown. (Scale bar, 20 μ m.) See also [Movies S6–S9](#).

regions, as previously discussed (19), and convert the high-angle F-actin branching (7, 20) into low-angle structures for actin bundling ([Fig. 3G](#)). It is possible that when complexed to actin, larger refilin/FLNA complexes may also form, that would explain the formation of a larger actin-rich superstructure in cells overexpressing refilins ([Figs. S14](#) and [S2](#)). Further studies are thus required to refine the specific molecular organization of the refilin/FLNA complex on F-actin.

In NIH 3T3 fibroblast cells, the perinuclear actin bundles stabilized by the refilin/FLNA complex most likely correspond to the “TAN lines” or perinuclear actin cap, previously described in mouse 3T3 fibroblasts, and which connect actin cables that form on the dorsal surface of nuclei to the outer nuclear membrane (2, 3). The proteins involved in this connection are referred to as the LINC complex (1). In epithelial NMuMG cells stimulated by TGF- β , RefilinB, and FLNA also contributed to organize perinuclear actin bundles that accompany EMT. The identification of a unique perinuclear actin network organization that is specifically regulated by the refilin/FLNA complex during a well-

characterized cell process, the EMT, opens a unique perspective for further functional analysis of this subcellular structure. In U373A and NIH 3T3 cells, the induction or inhibition of the actin cap was associated with discrete changes in nuclear and cellular shapes. In NMuMG cells stably expressing RefilinB shRNA, a delay in nuclear shape remodeling was observed but this did not affect cell viability. This suggests that the regulation of perinuclear actin bundle dynamics by the refilin/FLNA complex is probably not fundamental for cell viability in culture and is also consistent with the absence of a demonstrable phenotype in cultured FLNA-null fibroblasts (8, 9). In contrast, loss of function of FLNA in mice and humans is associated with severe cardiac, skeletal, vascular, and brain morphogenic defects during embryonic development (9, 11), and gain-of-function mutations that alter its avidity for actin lead to still further developmental anomalies (10, 12). Loss of FLNA shows similarities with loss of LINC complex proteins that structure the TAN lines in this respect (21). One LINC protein, LaminA, is dispensable for survival and proliferation in cell culture but its deletion or mutation are responsible for developmental defects and a broad spectrum of diseases (21, 22). We propose that alterations in FLNA function can induce dysregulation of perinuclear actin dynamics in specific developmental processes, such as EMT, leading to developmental defects or pathologies. In mice, maximal expression of FLNA in cardiac tissues occurs during expression of EMT programs associated with cardiac and vascular morphogenesis (23). Defective EMT programming may therefore explain the major cardiac and vascular defects seen in FLNA-null mouse embryos (8, 9). Similarly EMT programs are also important in development of human tissues, notably cardiac morphogenesis (24) and because several phenotypically discrete syndromes associated with FLNA mutations have defective morphogenesis of the cardiac valves as features of their phenotype (10, 12, 25), disruption of the FLNA–refilin-mediated formation of the actin cap could lie at the center of the pathophysiology of these disorders. It is also possible that altered perinuclear actin dynamics could contribute to abnormal neuronal migration, as seen in patients with FLNA mutations associated with periventricular heterotopia (11, 26). The possibility is supported by a recent study showing that nuclear migration within the neuroepithelium, mediated in part by LINC proteins,

is essential for radial neuronal migration in mice (27). Finally, the refilin binding domains of FLNA (including repeat 21) are highly conserved in other filamin isoforms. We have also confirmed a physical interaction of FLNB and FLNC with refilin by yeast two hybrid and co-IP. Hence, refilin very likely regulates the function of all cellular filamins. It would now be interesting to evaluate whether mutant filamin proteins found across the full range of human syndromes caused by mutations in filamins have altered responses to binding to refilins.

Materials and Methods

Materials. Antibodies, plasmids, ShRNA, and vector constructions are described in *SI Materials and Methods*.

Cell Culture. NIH 3T3, U373A (a clone obtained by xenograft of the human astrocytoma U373 MG selected for its tumorigenic properties), and M2 and A7 cells (18) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM containing 4.5 g/L glucose) plus 10% FCS. NMuMG cells were grown in DMEM + 4.5 g/L glucose, 10% FCS, and 0.1% insulin. For EMT induction, NMuMG medium was supplemented with TGF- β 2 ng/mL + EGF 2 ng/mL.

Cloning of Refilins. Rat FAM101A and FAM101B genes were cloned by RT-PCR on rat oligodendrocyte progenitor cell extracts. Sequences were confirmed by DNA sequencing. Nucleotide and protein sequences correspond to reference sequences Ensembl ENSRNOP00000001337 and ENSRNOT00000008982. The human RefilinA correspond to reference Ensembl ENSP00000374377.

Additional Methods. Yeast two-hybrid screening and directed yeast two-hybrid mating, production and transduction of adenovirus and lentiviral vectors, purification of FLNA–refilinA complex expressed in sf9 insect cells, visual assay for F-actin bundling, indirect immunofluorescence, and immunoprecipitation procedures are described in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by Institut National du Cancer INCA-PL 114 (to J.B.), Association contre le Cancer ARC-SFI20101201517 (to J.B.), Ligue Nationale contre le Cancer (O.G.), National Institutes of Health Grant HL-56252 (to J.H.H.), and the Harvard University Science and Engineering Committee Seed Fund for Interdisciplinary Science (F.N.). Work in S.P.R.'s laboratory is supported by the Marsden Fund of New Zealand and Curekids New Zealand. We thank colleagues from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 880 for mass spectrometry analyses, N. Bertacchi for technical assistance, Dr D. Markie for reagents, and Dr. J. LaMarre and C. Benaud for stimulating discussions.

1. Starr DA, Fridolfsson HN (2010) Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:421–444.
2. Luxton GW, Gomes ER, Folkner ES, Vintinner E, Gundersen GG (2010) Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science* 329:956–959.
3. Khataou SB, et al. (2009) A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19017–19022.
4. Zhou AX, Hartwig JH, Akyurek LM (2010) Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol* 20:113–123.
5. Feng Y, Walsh CA (2004) The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol* 6:1034–1038.
6. Stossel TP, et al. (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:138–145.
7. Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, Stossel TP (2007) Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol* 179:1011–1025.
8. Feng Y, et al. (2006) Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19836–19841.
9. Hart AW, et al. (2006) Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin A. *Hum Mol Genet* 15:2457–2467.
10. Kyndt F, et al. (2007) Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 115:40–49.
11. Fox JW, et al. (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21:1315–1325.
12. Robertson SP, et al.; OPD-spectrum Disorders Clinical Collaborative Group Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* 33:487–491.
13. Xu J, Lamouille S, Derynck R (2009) TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19:156–172.
14. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871–890.
15. Hirano M, et al. (2005) cfm is a novel gene uniquely expressed in developing forebrain and midbrain, but its null mutant exhibits no obvious phenotype. *Gene Expr Patterns* 5:439–444.
16. Busino L, et al. (2003) Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* 426:87–91.
17. Zhou BP, et al. (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6:931–940.
18. Cunningham CC, et al. (1992) Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255:325–327.
19. Lad Y, et al. (2007) Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding. *EMBO J* 26:3993–4004.
20. Hartwig JH, Tyler J, Stossel TP (1980) Actin-binding protein promotes the bipolar and perpendicular branching of actin filaments. *J Cell Biol* 87:841–848.
21. Folkner ES, Ostlund C, Luxton GW, Worman HJ, Gundersen GG (2011) Lamin A variants that cause striated muscle disease are defective in anchoring transmembrane actin-associated nuclear lines for nuclear movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:131–136.
22. Parnai VK, Manju K (2006) Laminopathies: Multiple disorders arising from defects in nuclear architecture. *J Biosci* 31:405–421.
23. Norris RA, et al. (2010) Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-A, during heart morphogenesis. *Dev Dyn* 239:2118–2127.
24. Person AD, Klewer SE, Runyan RB (2005) Cell biology of cardiac cushion development. *Int Rev Cytol* 243:287–335.
25. Robertson SP, et al. (2006) Frontometaphyseal dysplasia: Mutations in FLNA and phenotypic diversity. *Am J Med Genet A* 140:1726–1736.
26. Sheen VL, et al. (2001) Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 10:1775–1783.
27. Taverna E, Huttner WB (2010) Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67:906–914.

D.4 Résultats supplémentaires de la publication

Supporting Information

Gay et al. 10.1073/pnas.1104211108

SI Materials and Methods

Antibodies. Antibodies purchased from commercial suppliers are as follows: FLNA mouse monoclonal (AbNova; H00002316-M01), FLNA mouse monoclonal (USBiological; F4510), HA rat monoclonal (Roche; 3F10), Myosin IIA (Sigma; M-8064), and GFP mouse monoclonal (AbCam; ab-1218). Myc hybridomas were homemade. Chicken antibody against ReflinA was produced by Eurogentec, using a 15-aa-long peptide immunogen (QLTLEPRPRALRFGS). Guinea pig antibody against GST-fusion 1–120 N-terminal amino acid of ReflinB was produced by Proteogenix. Specific ReflinA and ReflinB antibodies were affinity purified and showed no cross-reactivity. Alexa-Fluor 546 phalloidin (Invitrogen; A22283) and secondary antibodies conjugated with Alexa488 (Molecular Probe), Cyanine3, or Cyanine5 (Jackson ImmunoResearch) were purchased from vendors as noted.

Plasmid Constructs. Plasmids encoding ReflinA N-terminal or C-terminal deletion mutants were obtained by PCR amplification of the FAM101A sequence using Phusion polymerase (Finnzymes). PCR products were cloned in the pcDNA myc His vector (Invitrogen) using XhoI and EcoRI restriction sites.

ReflinA deletion mutants (Δ BD1– Δ BD4) were obtained using QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) in accordance with the manufacturer's protocol using ReflinA–Myc plasmid as template.

Plasmids encoding HA-tagged FLNA deletion mutants were obtained by PCR amplification of the FLNA sequence (1) using Phusion polymerase (Finnzymes). PCR products were cloned in the pcDNA HA vector (Invitrogen) using BamHI and XhoI restriction sites. Plasmids encoding GFP-tagged FLNA (pEGFP–FLNA) deletion mutants were engineered using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit.

For Expression of FLNA–ReflinA complex in sf9 insect cells, pFASTBAC–Flag–FLNA was constructed as previously described (1). Mouse ReflinA cDNA was amplified by PCR and ligated into pFASTBAC–HTa or pFASTBAC–HTa–EGFP using EcoRI/NotI sites.

All constructs were verified by DNA sequencing.

Yeast 2 hybrid screening and yeast two-way mating. A custom-designed human fetal cartilage/chondrocyte pretransformed Matchmaker cDNA library in pGADT7–Rec/Y187 (Clontech Laboratories) was mated to baits pGBAD-BD ReflinA (amino acids 11–216)/AH109 or pGBAD-BD ReflinA (amino acids 66–216)/AH109 on YPAD medium for 6 h. A total of 5×10^8 library and bait cells were used for each mating. Mated yeast were then plated onto SD/–Leu/–Trp/–His media for primary reporter selection and colonies were picked to SD/–Leu/–Trp/–Ade plates for secondary selection. Plasmid preparations were made from colonies that remained after these selective steps and the inserts were sequenced using standard techniques.

Directed yeast two-hybrid matings were carried out using the same yeast two-hybrid GAL4 reporter system. Bait, pGBAD-BD ReflinA (amino acids 11–216), pGBAD-BD ReflinA (amino acids 66–216), and pGBAD-BD FLNA were transfected into yeast strain AH109 and mated directly to the preys pACT2B FLNA R21, pACT2B ReflinA (amino acids 11–216) transfected into yeast strain PJ69-4 α . Mating was carried out on YPAD medium for 6 h before replica plating to selective medium SD/–Leu/–Trp/–Ade. pGBAD-BD and pJ694 α vectors and yeast strain PJ694 α were gifted by David Markie (Dunedin School of Medicine, Dunedin, New Zealand).

ShRNA vector constructions. ReflinB-targeting shRNA sequences were designed from DESIR software as follows:

5'-CCGGCGATGGGCTAGCCGATGAATTCAGAGATTCATCGGCTAGCCCATCG TTTTG-3' and 5' AATTCAA-AAACGATGGGCTAGCCGATGAATCTCTTGAATTCATCGGCTAGCCCATCG-3' for shRNA #3; 5'-CCGGCCACCACTCTGGATTACAATTCAAGAGATTGTAATCCAGAGTG-GTGGTTTG-3' and 5' AATTCAAAAACCACCACTCTGGA-TTACAATCTCTTGAATTGTAATCCAGAGTGGTGG-3' for shRNA #5. ShRNA sequences were synthesized, pair annealed, and subcloned into pLKO.1 vector (Addgene) containing U6 human shRNA promoter, HIV packaging Psi sequence, and LTR repeats. This vector also contains the puromycin resistance genes for selection of stable cell lines.

Adenovirus infection. Recombinant adenovirus particles expressing GFP or GFP–ReflinA were obtained from ViraQuest. A total of 4×10^4 cells were plated on polylysine-coated glass coverslips the day prior to infection. Cells were incubated with 15 multiplicity of infection (MOI) viral particles diluted in minimal volume of growth medium for 4 h, then completed with fresh medium, and placed in an incubator overnight. The next day, cells were washed and incubated in fresh medium.

Production and transduction of lentiviral vectors. To accomplish transgene incorporation into lentiviral capsids, pLKO.1 vectors were cotransfected with pSPAX.2 packaging vector (encoding HIV Gag, Pol, and Rev proteins) in combination with pMD2.G (encoding VSV-G) into 293T cells using Lentiphos HT (Clontech). The medium was then replaced with complete DMEM containing 10% FCS and the virus-containing supernatants were harvested 48 h posttransfection. All virus stocks were filtrated at 0.45 μ m, aliquoted, and frozen at -80°C . For infection, NIH 3T3 and NMuMG cells were plated into 6-well plates (2×10^5 in 2 mL of serum-supplemented DMEM). The next day, adherent cells were incubated with lentiviral particles (1–5 MOI) diluted in 2 mL of serum-supplemented medium with 8 μ g/mL polybrene (Sigma). Transduction was maintained for 16 h, the cells were then washed, and the medium replaced. For stable transduction, puromycin selection (5 or 0.5 μ g/mL for NIH 3T3 or NMuMG cells, respectively; Sigma) was performed starting 36 h post-infection and maintained during the time course of our experiments. Silencing efficiency was evaluated using Western blotting and immunofluorescence.

Immunofluorescent Staining. Cells were grown at a 4×10^4 density on poly-L-lysine-coated coverslips, and then fixed with either 4% paraformaldehyde in PBS followed by permeabilization with 0.2% Triton X-100 or fixed using methanol. Cells were incubated with blocking buffer (5% newborn goat serum-TBS) and incubated with primary antibodies overnight at 4°C . Cells were washed in TBS and stained with the appropriate secondary antibodies.

Images were obtained with a Zeiss (Axiovert 200M) microscope or with a Leica (TCS SP2) confocal microscope. Hoescht, Alexa488, Cyanine3 (Cy3), and Cyanine5 (Cy5) fluorescence were excited and collected sequentially (400 Hz line by line).

Coimmunoprecipitation. Cells grown in 10-cm dishes were transfected with 6 μ g of the appropriate plasmid using Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen). After 18 h, cells were lysed in 500 μ L lysis buffer (40 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.3% Triton X-100, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA) supplemented with anti-proteases and antiphosphatases. Protein G sepharose beads

(Sigma) coupled to mouse anti-myc antibody were incubated with the lysate for 2 h at 4 °C. Precipitates were washed four times in lysis buffer, solubilized in SDS sample buffer, fractionated by SDS/PAGE, and analyzed by Western blotting.

Purification of FLNa–RefilinA Complex Expressed in sf9 Insect Cells.

The fusion proteins were expressed in sf9 insect cells in accordance with manufactures' instructions and the insect cells (5×10^8 cells) were harvested 72 h postinfection. After washing with PBS, the cells were frozen with liquid N₂ and stored at –80 °C. Frozen cells were lysed in 40 mL of 20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1% Triton X-100, 1 mM β -mercaptoethanol (ME), 2 mM PMSF, 10 μ g/mL aprotinin, and 10 μ g/mL leupeptin, at 4 °C. The extracts were centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min at 4 °C and loaded onto a Ni-NTA column (1 mL; Qiagen). The column was washed with washing solution I (20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 20 mM imidazole, 1 mM β -ME, 200 mM NaCl, 0.1% Triton X-100) followed by washing solution II (20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 20 mM imidazole, 100 mM NaCl, 1 mM β -ME), and bound recombinant proteins were eluted with 5 mL of 20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 200 mM imidazole, 1 mM β -ME. Purified proteins were mixed with 20 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1 mM β -ME, 2 mM PMSF, 10 μ g/mL aprotinin, and 10 μ g/mL leupeptin and incubated with 1.0-mL anti-FLAG M2 agarose in a column (Sigma-Aldrich) for 1 h at 4 °C. The beads were washed with 20 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, and 0.1% Triton X-100. The bound fusion proteins were eluted with the washing buffer containing 100 μ g/mL FLAG peptide (Sigma-Aldrich). Purified proteins were concentrated using an Amicon Ultra-15 (Millipore) with a molecular-weight cutoff of 50,000 and gel filtered on Superose 6 column (GE Healthcare). His–DsRed and

His–EGFP were purified using Ni-NTA column followed by Superdex 200 gel filtration column (GE Healthcare).

Visual Assay for F-Actin Bundling and Recruitment of FLNa–RefilinA Complex.

A total of 12 μ M G-actin was mixed with 0.12 μ M Flag–FLNa or Flag–FLNa/His–EGFP–RefilinA complex and polymerization of actin was initiated by adding 10 \times actin polymerization buffer (final: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM ATP) in the presence of 2 units of Alexa-Fluor 568 phalloidin. The samples were incubated at 37 °C for 1 h. For transmission electron microscopy, samples were diluted to 2 μ M F-actin in actin polymerization buffer and a drop was briefly placed on the surface of a glow-discharged carbon and formvar-coated copper grid. The grid was washed in polymerization buffer, negatively stained with 2% uranyl acetate, air dried, and viewed in a JEOL-1200 EX electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

Electron Microscopy. U373A cells, attached to 5-mm round glass coverslips, were infected with RefilinA–GFP viral particles for 48 h. The cells were permeabilized with 0.75% Triton X-100 in PHEM buffer (2) containing 1 μ M phalloidin and 0.05% glutaraldehyde for 2 min at 37 °C, washed with PHEM buffer, and then fixed with 1% glutaraldehyde in PHEM buffer for 10 min. Coverslips were washed extensively in distilled water, rapidly frozen on a helium-cooled copper block, freeze dried at –80 °C, and rotary coated with 1.5 nm of tantalum/tungsten at a 25° angle and 5 nm of carbon at 90° without rotation. The metal replicas were floated off the coverslip using 25% hydrofluoric acid, washed in water, and collected on carbon-coated formvar 200-mesh copper grids. Grids were photographed in a JEOL 1200-EX electron microscope at 80 kV. Digital “anaglyph” 3D images from $\pm 12^\circ$ tilted stereo paired micrographs were prepared as described (3).

1. Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, Stossel TP (2007) Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol* 179:1011–1025.
2. Schliwa M, van Blerkom J, Porter K (1981) Stabilization of the cytoplasmic ground substance in detergent-opened cells and a structural and biochemical analysis of its composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4329–4333.

3. Heuser JE (2000) Membrane traffic in anaglyph stereo. *Traffic* 1:35–37.

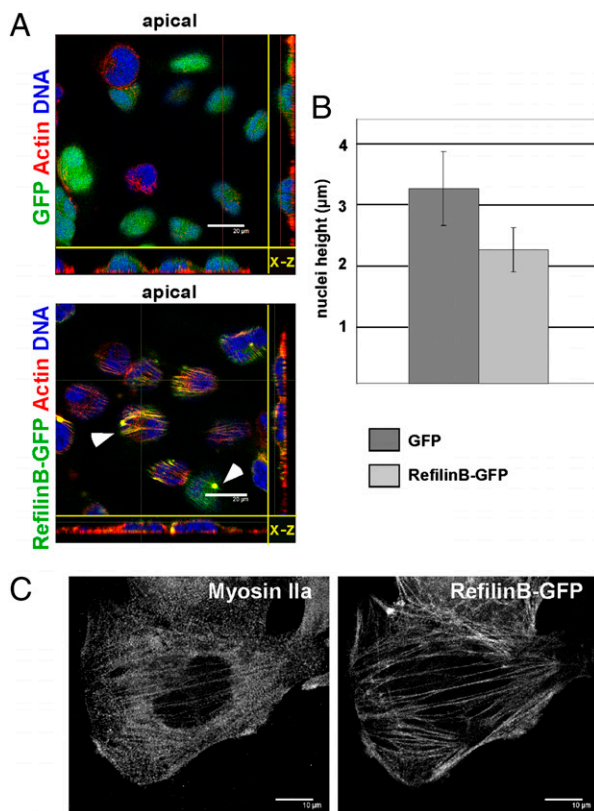


Fig. S1. RefilinB promotes perinuclear actin bundles in U373A cells. (A and B) U373A cells were infected with recombinant adenovirus expressing GFP-control or GFP-RefilinB. (A) Cells were fixed with PFA, stained with Alexa 546 phalloidin (red) and Hoechst (blue) for actin and the nucleus, respectively. Merged confocal microscopy sections at the apical surface and profile view (xz) of full reconstitution are shown. Arrowheads point to actin superstructures. (Scale bar, 20 μm .) See also corresponding [Movies S1](#) and [S2](#). (B) Nuclei height of 250 cells expressing GFP or RefilinB-GFP was measured using confocal microscopy. Mean height is represented in [B](#). (C) U373A infected with recombinant adenovirus expressing RefilinB-GFP were fixed and immunostained with rabbit anti-Myosin IIa as indicated. (Scale bar, 10 μm .)

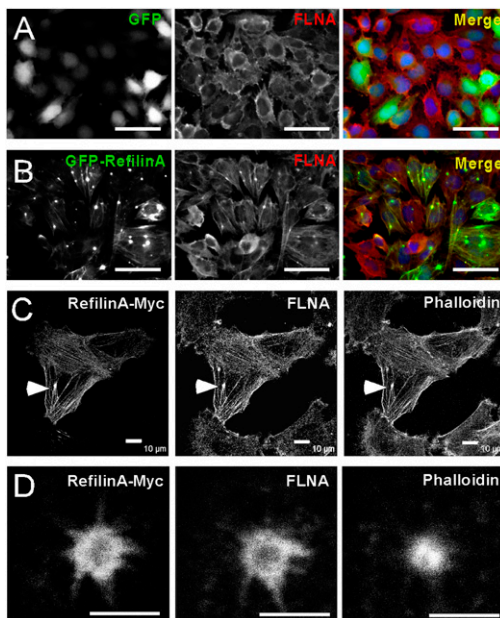


Fig. S2. RefilinA promotes the recruitment of FLNA on actin bundles and the formation of actin superstructures. (A and B) U373A were infected with recombinant adenovirus expressing GFP-control (A) or GFP-RefilinA (B). Cells were fixed and immunostained with mouse anti-FLNA (red). (C and D) U373A cells, transfected with RefilinA-Myc plasmid were fixed with PFA and coimmunostained with rabbit anti-Myc, mouse anti-FLNA antibodies, and actin was stained with Alexa 486 phalloidin. In C, arrowhead points to an actin superstructure. D shows that RefilinA-Myc and FLNA are concentrated at the periphery of the actin superstructure. [Scale bar, 10 μ m (C) and 2 μ m (D).]

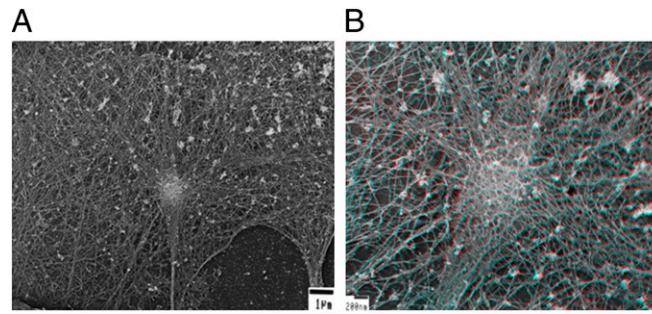


Fig. S3. Representative electron micrographs showing the structure of cytoskeletal F-actin foci generated in U373A cells by the expression of RefilinA. (A) Low magnification view of the cortical cytoskeleton. (Scale bar, 1 μm.) (B) Higher magnification 3D anaglyph of stereo paired images taken at +12° tilt of the F-actin ultrastructure. (Scale bar, 200 nm.)

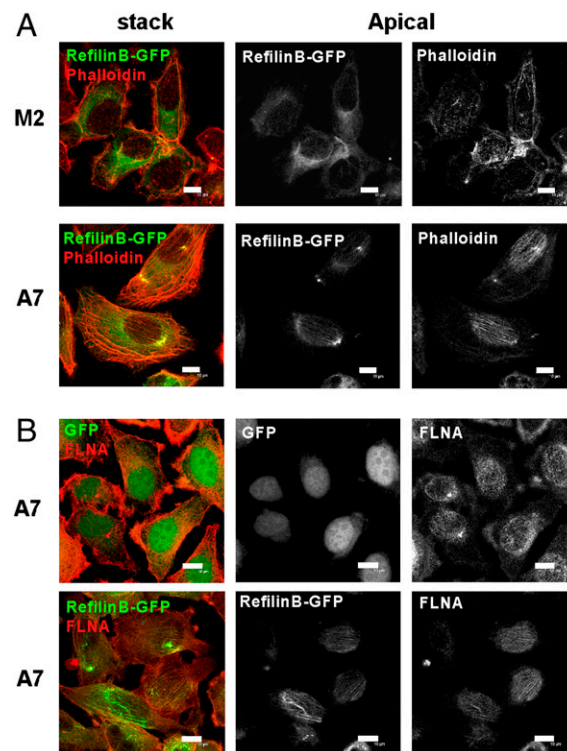


Fig. S4. Perinuclear actin stress fibers strictly depend on interaction of Refilin with FLNA. (A and B) M2 cells or A7 cells, as indicated in the *Left* margin, infected with recombinant adenovirus expressing RefilinB-GFP (A). (B, *Lower*) or control GFP (B, *Upper*) were fixed and stained with Alexa 486 phalloidin (A) or immunostained with anti FLNA (B). Full merged confocal reconstitution (*Left*) and individual black and white staining at the apical surface are shown. (Scale bar, 10 μm.)

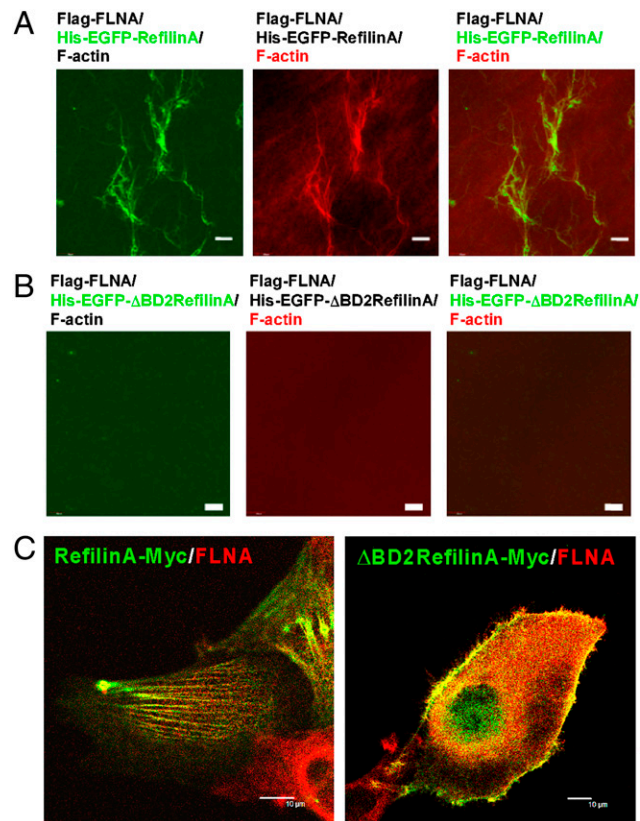


Fig. S5. Deletion of BD₂ of RefilinA abrogates its bundling activity in vitro and in vivo. (A and B) Confocal fluorescent microscopy of 12 μ M G-actin mixed with 0.12 μ M Flag-FLNA/His-EGFP-RefilinA complex (A) or 0.12 μ M Flag-FLNA/His-EGFP- Δ BD₂ RefilinA complex (B) stained with Alexa-Fluor 568 phalloidin. (Scale bar, 200 μ m.) (C) U373A cells, transfected with Myc-tagged RefilinA (Left) and Δ BD₂ RefilinA mutant (Right) were fixed and immunostained with mouse anti-FLNA antibody (red) and rabbit anti-Myc (green). (Scale bar, 10 μ m.)

		* * * * *	
GPIb α		- F R S S L F L W V -	571---610
RefilinBD2	1---137	- Y R S Q L T L E P -	145---204
Integrin β 1A		- Y K S A V T T V V -	771---778
Integrin β 7		- Y K S A I T T T I -	740---747
Integrin β 2		- F K S A T T T V M -	755---762
Integrin β 3		- Y K E A T S T F T -	767---779
Migfilin		- V A S S V F I T L -	17---373
RefilinBD4	1---163	- A R S S F R T T L H	172---204
FilGAP		- F S T F G E L T V -	734---748
CFTR		- V V S K L F F S W -	19---1480

Fig. S6. Amino acid sequence alignment of the FLNA-binding sites of human glycoprotein Ib α (GPIb α), β integrins, FilGAP, migfilin, and CFTR and comparison with putative RefilinA binding sites BD₁ and BD₄. Sequence alignment of RefilinA BD₂ and BD₄ with proteins that interact with filamin on domain 21 was done using Clustal W2 multisequence alignment program distributed by EMBL. Amino acids indicated with asterisks are mainly involved in binding interaction.

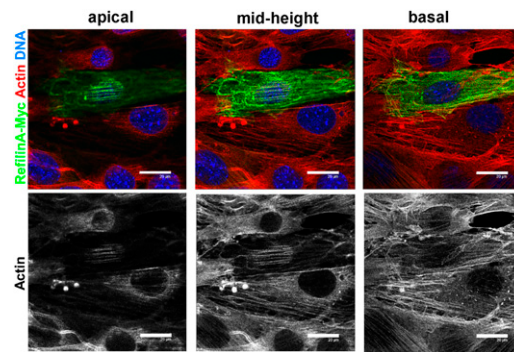
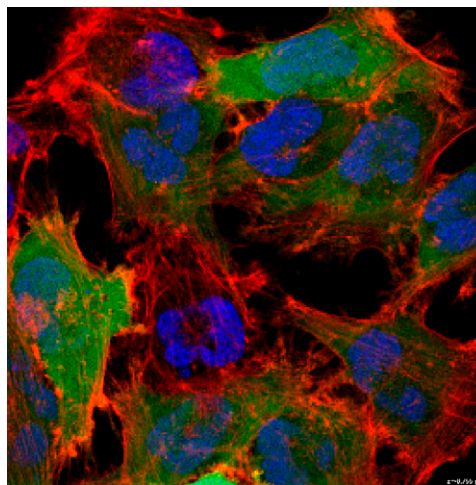
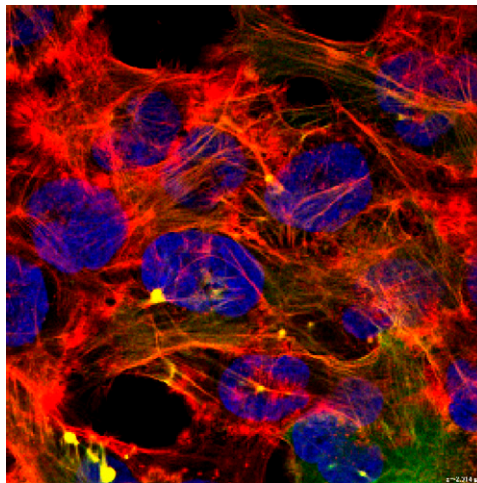


Fig. S9. RefilinA rescues actin cap formation in stably transfected NIH 3T3 cells with recombinant lentivirus expressing RefilinB-shRNA #5. Stably transfected 3T3 cells with recombinant lentivirus expressing RefilinB-shRNA #5 were transfected with recombinant RefilinA-Myc plasmid. Cells were fixed and labeled with rabbit anti-Myc antibody (green), Alexa 486 Phalloidin (red) and Hoechst (blue). Merged confocal microscopy images and actin staining at the apical, mid-height, and basal surface are shown. (Scale bar, 20 μ m.) RefilinA-Myc promotes formation of an actin cap that correlates with decrease cell height.



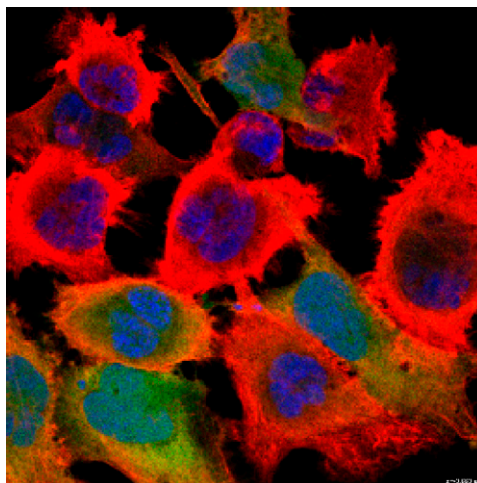
Movie S1. (related to Fig. S1A) Confocal (parallel) cross-sections of the actin filament (red) and GFP (green) in U373A cells shown from top to bottom.

[Movie S1](#)



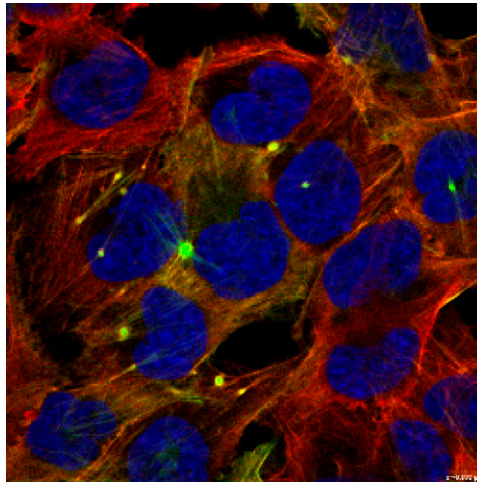
Movie S2. (related to [Fig. S1B](#)) Confocal (parallel) cross-sections of the actin filament (red) and RefilinB-GFP (green) organization in U373A cells shown from top to bottom.

[Movie S2](#)



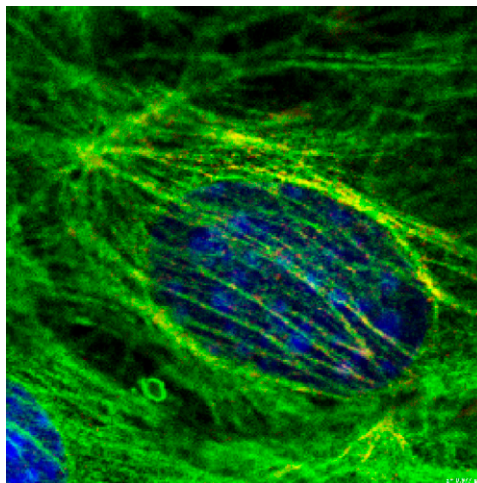
Movie S3. (related to [Fig. 1D](#)) Confocal cross-sections of the FLNA immunostaining (red) and GFP fluorescence (green) in U373A cells shown from the top to the bottom.

[Movie S3](#)



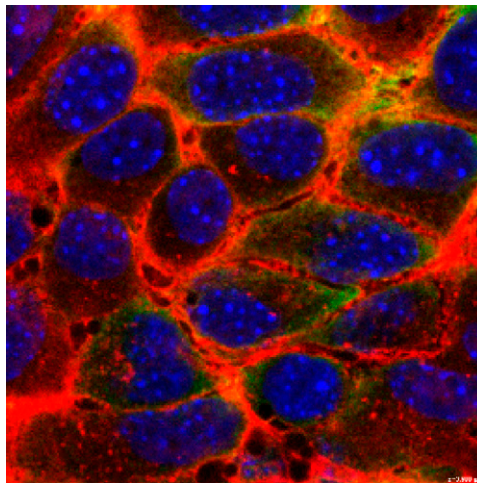
Movie S4. (related to Fig. 1E) Confocal cross-sections of the FLNA (red) and RefilinB-GFP (green) staining in U373A cells shown from top to bottom.

[Movie S4](#)



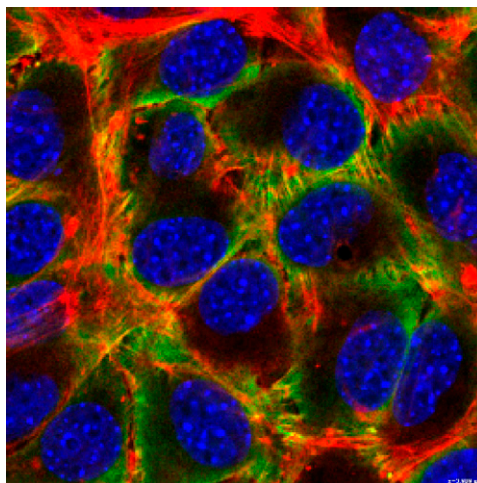
Movie S5. (related to Fig. 4C) Confocal cross-sections of the FLNA (red) and RefilinB (green) immunostaining in NIH 3T3 cells shown from top to bottom.

[Movie S5](#)



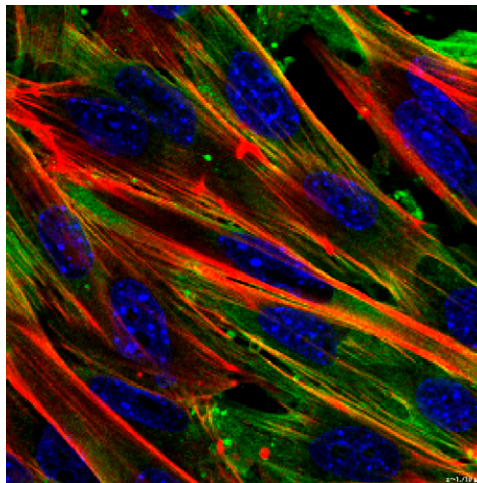
Movie S6. (related to Fig. 5D, control) Confocal cross-sections of the FLNA immunostaining (green) and phalloidin staining (red) in NMuMG cells shown from top to bottom.

[Movie S6](#)



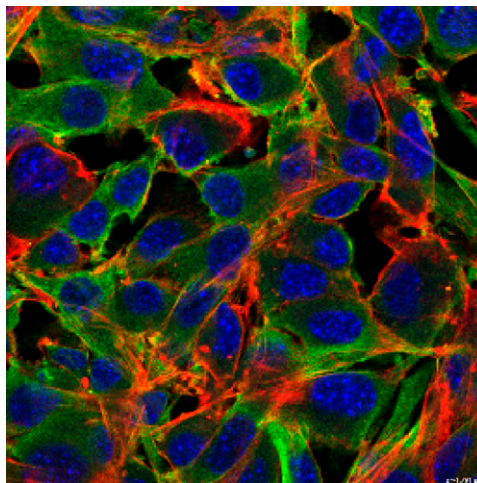
Movie S7. (related to Fig. 5D, TGF-β 20 h) Confocal cross-sections of the FLNA immunostaining (green) and phalloidin staining (red) in NMuMG cells treated with TGF-β for 20 h shown from top to bottom.

[Movie S7](#)



Movie S8. (related to Fig. 5D, TGF- β 48 h) Confocal cross-sections of the FLNA immunostaining (green) and phalloidin staining (red) in NMuMG cells treated with TGF- β for 48 h shown from top to bottom.

[Movie S8](#)



Movie S9. (related to Fig. 5D, shRefilinB TGF- β 48 h) Confocal cross-sections of the FLNA immunostaining (green) and phalloidin staining (red) in stably transfected NMuMG cells with RefilinB shRNA, treated with TGF- β for 48 h shown from top to bottom.

[Movie S9](#)

D.5 Résultat complémentaire : RefilineA interagit avec les dimères de FilamineA

Comme la FilamineA est présente dans la cellule sous forme de dimère, notre but a été de déterminer si une molécule de RefilineA était capable de se lier à deux molécules de FilamineA. Dans un tel contexte, une protéine mutante de FilamineA dépourvue du domaine de dimérisation pourrait lier la FilamineA endogène en présence de RefilineA. Une approche complémentaire d'immunoprécipitation et de mutagenèse ciblant les domaines 19-22 de la FilamineA, nous avons pu caractériser l'interaction entre RefilineA-myc et la FilamineA endogène (Figure 3f (Gay, Gilquin et al. 2011)). Par des techniques d'immunofluorescence, nous confirmons cette interaction par le fait que le mutant 19-22 dépourvu du domaine de dimérisation présente une localisation diffuse en l'absence de RefilineA mais est relocalisé sur les fibres de stress d'actine en sa présence (Figure 24).

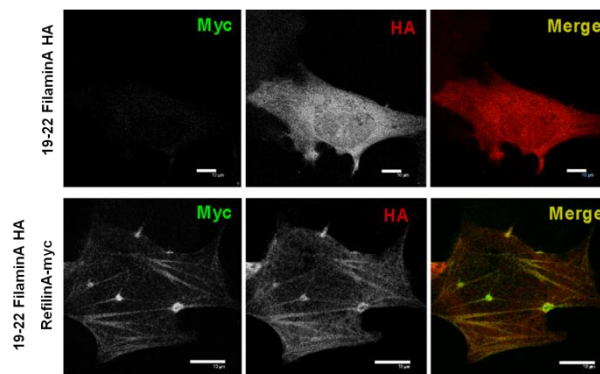


Figure 24 : RefilineA se lie à la fois avec la FilamineA endogène et un mutant de FilamineA dépourvu du domaine de dimérisation.

Les cellules U373A ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine mutante de la FilamineA contenant les domaines 19-22 étiquetée HA (19-22 FilamineA HA) avec ou sans le plasmide codant pour la protéine RefilineA étiquetée myc (RefilineA-myc). Elles ont ensuite été fixées au PFA et immunomarquées avec un anticorps de souris contre l'étiquette HA (rouge) et un autre de lapin contre l'étiquette myc (vert).

Barre: 10µm.

D.6 Conclusions

En conclusion, mes travaux ont permis de montrer que le complexe Refiline/FilamineA participe à l'organisation de la coiffe d'actine dans les fibroblastes et à une nouvelle structure d'actine périnucléaire qui se forme de façon transitoire au cours de la TEM et qui semble couplée à l'aplatissement nucléaire et cellulaire lors de la TEM. Ces observations suggèrent un rôle clé pour la Filamine A dans les mécanismes associés à la TEM.

En conditions physiologiques, des événements de TEM ont lieu lors du développement embryonnaire pour la formation du cœur, du palais et de nombreux autres tissus tels que les os, les muscles et le système nerveux périphérique (Nieto, Sargent et al. 1994; Savagner, Boyer et al. 1994; Hay 1995; Savagner 2001). La FilamineA est exprimée principalement lors du développement et particulièrement dans ces structures. Par exemple, lors de la morphogenèse cardiaque TEM-dépendante, la FilamineA est exprimée abondamment, notamment dans les cellules de l'épicaarde et de l'endocarde ainsi que les cellules mésenchymateuses qui ont subi une TEM ou celles provenant des cellules de la crête neurale (Norris, Moreno-Rodriguez et al. 2010).

La perte de la FilamineA est à l'origine de défauts de développement squelettique et cardiovasculaire (Cunningham et al., 1992; Eksioglu et al., 1996; Feng et al., 2006; Fox et al., 1998; Nagano et al., 2004; Sheen et al., 2002). Ces phénotypes présentent de nombreuses similitudes avec les phénotypes de défauts de TEM ou de signalisation TGF- β (Mercado-Pimentel and Runyan 2007). Finalement, la FilamineA participe à la signalisation Smad en régulant la phosphorylation de Smad2 en sa partie C-terminale par ALK5, provoquant ainsi une inhibition de la translocation nucléaire de Smad2 et de son activité transcriptionnelle (Sasaki, Masuda et al. 2001; van der Flier and Sonnenberg 2001). Au vu de l'interaction de la FilamineA avec les Smads 1, 4, 5 et 6, ceci suggère une implication plus générale de la FilamineA dans la signalisation TGF- β (Lasfar and Cohen-Solal 2010).

E. Régulation et fonction du complexe Refiline/FilamineA dans la différenciation des cellules neurales multipotentes

E.1 Introduction

Lors du développement des mammifères, des cellules souches seront à la fois à l'origine des neurones et cellules gliales. Il existe également chez les rongeurs adultes des cellules qui participent à la neurogenèse et à la formation de nouvelles cellules gliales dans le système nerveux central (SNC), les « cellules souches neurales » multipotentes (Malatesta, Appolloni et al. 2008). Elles constituent une source de progéniteurs neuraux en cas de perte des neurones déjà existants (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002; Aguirre and Gallo 2004). Elles génèrent aussi des progéniteurs de cellules gliales qui contribuent, notamment, à la régénération des oligodendrocytes après altération du SNC (trauma, réponse auto-immunitaire, infection virale) (Franklin and Ffrench-Constant 2008). La différenciation des cellules souches neurales adultes en progéniteurs est couplée à leur migration vers la substance blanche et le parenchyme cérébral.

La recherche de nouveaux gènes induits au cours de la transition des cellules souches en progéniteurs gliaux nous a permis d'identifier la protéine RefilineA. La deuxième partie de mon travail de thèse a porté sur la caractérisation des protéines RefilineA et RefilineB dans un modèle de cellules souches neurales en culture : les cellules progénitrices multipotentes (CPM). J'ai initié une étude fonctionnelle du complexe Refiline/FilamineA dans la différenciation des CPMs adultes avec une attention particulière portée sur les régulations de RefilineA et RefilineB.

E.1.1 Origine commune des neurones et cellules gliales

Les neurones et les cellules gliales dérivent du tube neural qui se forme lors de la mise en place du SNC à partir de la plaque neurale (ou neuroépithélium) issue d'un épaissement de l'ectoderme. Ce tube est organisé de façon rostro-caudale et sa partie antérieure formera le cerveau alors que la partie caudale se différenciera pour former la moelle épinière (Liu and Rao 2004). Les hémisphères cérébraux apparaîtront après accroissement par prolifération et migration des neurones dans les couches superficielles, conduisant *in fine* à la formation des six couches du cortex cérébral.

E.1.1.1 Apparition des cellules du système nerveux central lors du développement embryonnaire

La différenciation du SNC passe tout d'abord par un développement embryonnaire commun aux neurones et cellules gliales, ensuite, les différentes populations cellulaires émergeront. Chez les

mammifères, le premier tiers de la gestation permet l'apparition, d'une part des premiers neurones et d'autre part des progéniteurs à l'origine du reste de la population neuronale et des cellules gliales. La genèse des oligodendrocytes aura lieu principalement en période post-natale (Figure 25).

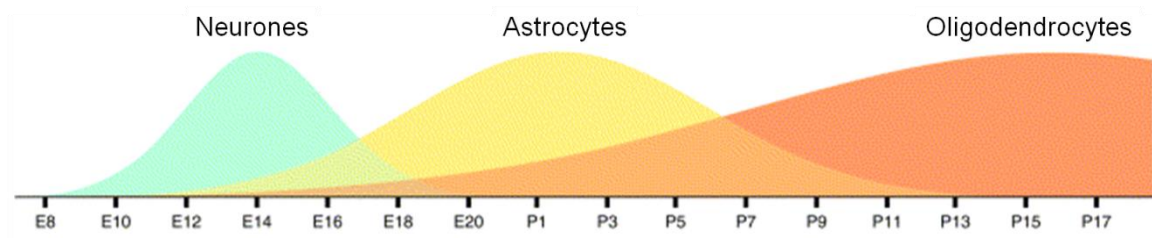


Figure 25: Apparition des trois types cellulaires du système nerveux central au cours du développement chez le rat.

E.1.1.2 Les cellules souches neurales embryonnaires : Les cellules neuroépithéliales

Les cellules neuroépithéliales sont des cellules multipotentes présentes au niveau du tube neural et sont à l'origine de tous les neurones et cellules gliales qui composent le SNC, directement ou indirectement (Liu and Rao 2004; Malatesta, Appolloni et al. 2008).

Les cellules neuroépithéliales s'organisent en une couche prolifératrice sur toute l'épaisseur du tube neural et présentent des caractéristiques épithéliales telles que la polarisation le long de l'axe apico-basal, la présence de jonctions adhérentes et serrées au niveau apical (coté lumière du tube neural) et d'adhésions focales en contact de la lame basale (Gotz and Huttner 2005). On dit que l'épithélium est pseudostratifié car, bien qu'il existe une unique épaisseur de couche, le noyau adopte des positions différentes le long de l'axe apico-basal lors du cycle cellulaire (« migration neuronale intercinétique ») et il en résulte une apparence en multicouche (Taverna and Huttner 2010).

Les cellules neuroépithéliales vont subir des divisions prolifératives, c'est à dire symétriques, pour donner deux cellules filles neuroépithéliales identiques. Puis, entre E8 et E 11, auront lieu des divisions asymétriques pour générer une cellule neuroépithéliale et une autre davantage différenciée : soit un neurone soit des cellules de la glie radiaire (Figure 26) (Caviness and Takahashi 1995; Gotz and Huttner 2005). Les cellules de la glie radiaire présentent une polarité apico-basale et étendent de longs prolongements au niveau basal jusqu'à la pie-mère (Figure 26). Elles seront à la fois à l'origine du reste de la population neuronale et des cellules progénitrices oligodendrogiales (CPO) et astrocytaires (Figure 26) (Anthony, Klein et al. 2004; Malatesta, Appolloni et al. 2008).

Les cellules neuroépithéliales et les cellules de la glie radiaire présentent des caractéristiques épithéliales qui disparaîtront lors de leur engagement dans les diverses voies de différenciation neurale. Elles se trouvent au niveau ventral et devront migrer pour coloniser le parenchyme une fois engagées

dans un lignage. Il apparait donc clair que le cytosquelette sera requis lors de ce phénomène, cependant les mécanismes mis en jeu n'ont pas été élucidés.

Les CPOs sont des cellules extrêmement motiles qui migreront pour envahir l'ensemble du SNC à partir des cellules neuroépithéliales de la VZ puis des progéniteurs de la zone sous ventriculaire (subventricular zone, SVZ) (de Castro and Bribian 2005). La majorité proviendra d'une première vague de migration à E 11.5 depuis des zones spécifiques au niveau ventral, puis une seconde aura lieu depuis une région dorsale à E 14.5 (Vallstedt, Klos et al. 2005). Il existe également une troisième vague pendant la vie post-natale pour l'éventuel remplacement des CPOs endommagés (Kessaris, Fogarty et al. 2006). La motilité des CPOs a été observée *in vivo* chez le poisson-zèbre où ces cellules étendent de multiples prolongements pour explorer l'environnement cellulaire et peuvent, soit proliférer et continuer leur migration, soit s'orienter vers une différenciation guidée par les signaux environnementaux (Kirby, Takada et al. 2006).

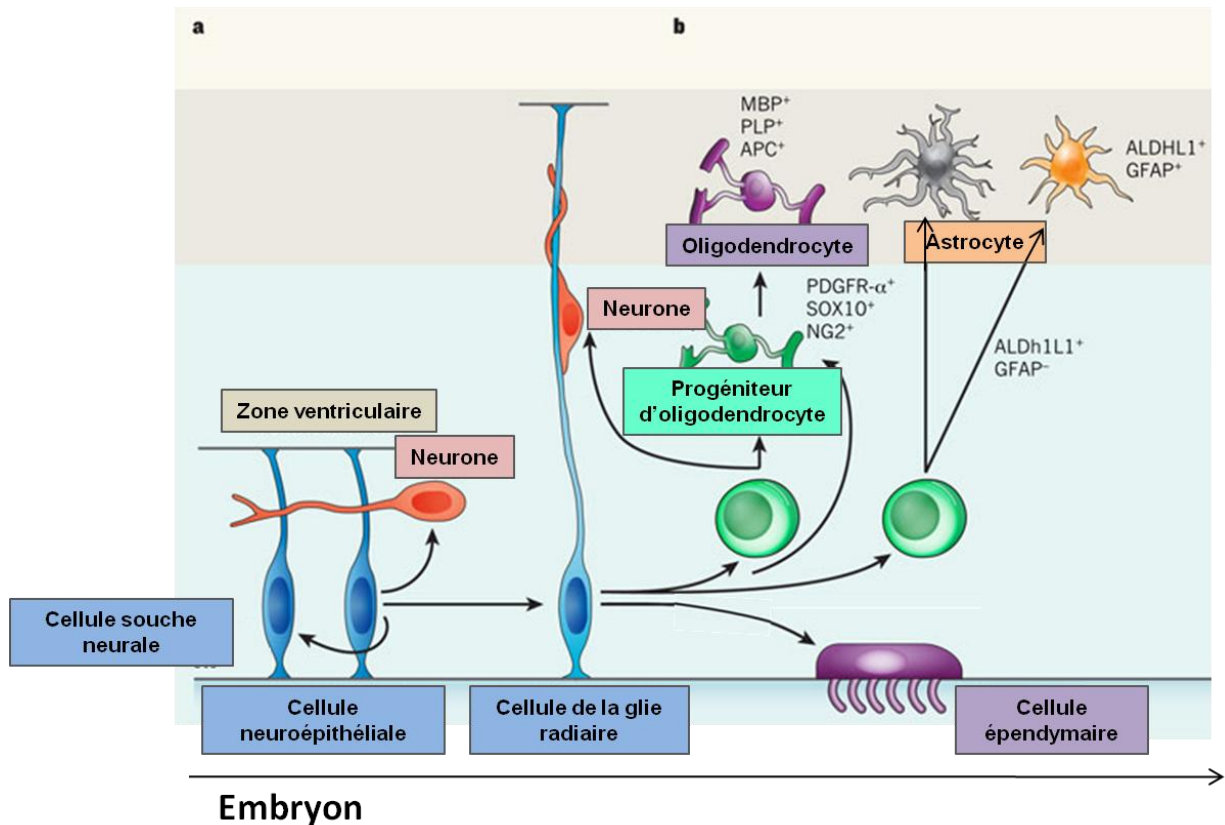


Figure 26: Origine des cellules du SNC lors du développement.

a : les cellules neuroépithéliales tapissent les ventricules lors de la fermeture du tube. Elles généreront certains neurones ou se transformeront en cellules de la glie radiaire lors de la neurogenèse.

b : les cellules de la glie radiaire (bleu) produisent des progéniteurs intermédiaires (cellules vertes rondes) et des cellules progénitrices oligodendrogiales (cellules vertes avec prolongements), qui donneront respectivement des neurones (rouge) et oligodendrocytes (violet). Les cellules de la glie radiaire peuvent également donner des astrocytes et cellules intermédiaires qui s'amplifieront et se différencieront en astrocytes (gris ou orange).

Les flèches noires indiquent l'auto-amplification ou la différenciation d'un type cellulaire à un autre.

Marqueurs de cellules macrogliales et leurs précurseurs: ALDH1L1, « aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 »; APC, « adenomatous polyposis coli »; GFAP, « glial fibrillary acidic protein »; MBP, « myelin basic protein »; PDGFR- α , « platelet-derived growth factor receptor- α »; PLP, « proteolipid protein 1 », NG2, SOX10, SRY-box 10.

D'après (Rowitch and Kriegstein 2010).

E.1.1.3 Les cellules souches neurales adultes

L'hypothèse d'une régénération des populations du SNC chez les mammifères adultes a longtemps été rejetée, mais il est maintenant clairement établi qu'elle existe. Chez les mammifères adultes, des cellules souches persistent dans plusieurs régions du télencéphale, en particulier dans la zone sous ventriculaire latérale et de la voie de migration rostrale (Aguirre and Gallo 2004). Elles sont capables de régénérer des populations neuronales ou gliales endommagées au cours de la vie (Cassidy

and Frisen 2001). On les retrouve dans des régions bien localisées, les «niches neurogéniques », où elles sont régulées par les cellules voisines et les facteurs environnementaux présents (Doetsch 2003).

Ces cellules souches adultes possèdent des propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence et peuvent être cultivées sous forme de neurosphères ; elles auraient pour origine soit des cellules apparentées aux cellules de type astrocytaire GFAP+ (telles que les cellules de la glie radiaire présentées dans la Figure 27a, cellules de type B), soit des cellules épithéliales épendymaires (Figure 27b).

Les cellules souches du premier modèle se situeraient au sein de la zone sous-ventriculaire sous la forme d'amas de précurseurs neuronaux ou neuroblastes (appelées cellules de type « A ») (Doetsch 2003). Des cellules de type « B » aux caractéristiques astrocytaires (GFAP+, notamment) forment une gaine autour de ces neuroblastes alors que les cellules de type « C », ou progéniteurs neuronaux, sont des amas de cellules hautement proliférantes (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002). Un lignage direct entre ces types cellulaires a été identifié, mettant en évidence une origine gliale des neuroblastes de la zone sous-ventriculaire (voir Figure 27b). Pour plus d'informations, se référer à (Chojnacki, Mak et al. 2009).

Dans le second modèle, les cellules épendymaires ciliées organisées en monocouche qui séparent le ventricule de la zone sous-ventriculaire et servent notamment à la circulation du liquide céphalo-rachidien constitueraient un réservoir pour la neurogenèse adulte (Johansson, Momba et al. 1999; Coskun, Wu et al. 2008). Cependant cette hypothèse reste controversée (voir Figure 27b) (Chiasson, Tropepe et al. 1999; Spassky, Merkle et al. 2005).

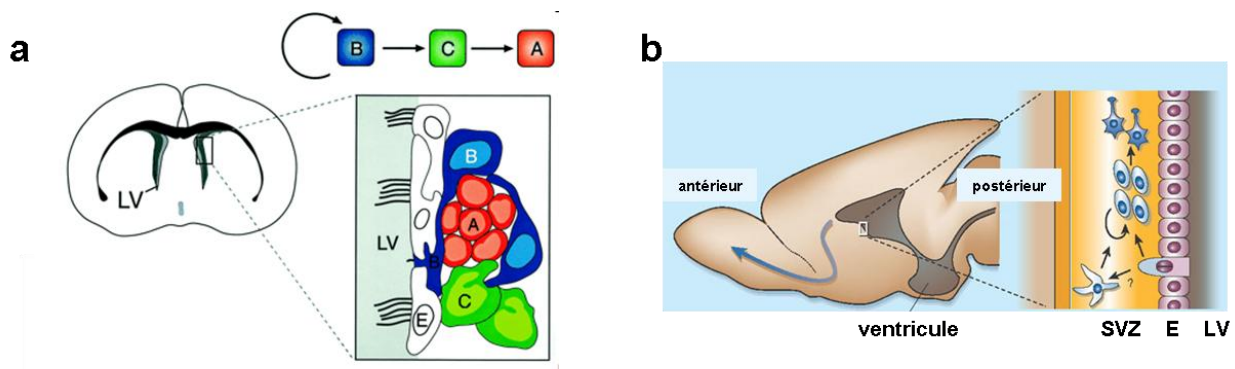


Figure 27: Neurogenèse dans les cerveaux mammifères adultes.

a : Une chaîne de cellules de type A (rouge) est entourée de cellules de type B aux caractéristiques astrocytaires (bleu) et il existe des cellules hautement proliférantes : les cellules de type C (vert). Les cellules de type B génèrent des cellules de type C qui donneront des cellules de type A. D'après (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002).

b : Dans ce modèle, les CPMs de la couche épendymaire se différencient en une population de cellules se divisant rapidement (cellules ovales) qui se différencient ensuite en neurones (cellules bleu foncé). Les astrocytes apparentés aux cellules de la glie radiaire GFAP+ (cellules bleu clair) pourraient être des cellules indépendantes ou des intermédiaires entre les cellules épendymaires et les progéniteurs. Ils migreront le long de la voie de migration rostrale jusqu'au bulbe olfactif (voie indiquée par la longue flèche bleue dans la partie de gauche du schéma).

Zone sous-ventriculaire (SVZ), couche épendymaire épithéliale (E) et ventricule latéral (LV).

D'après (Johansson, Momma et al. 1999; Cassidy and Frisen 2001).

E.1.2 Implication de la Filamine dans la différenciation des cellules souches

Chez la souris, les FilamineA et FilamineB sont exprimées lors du développement cortical (E12,5 – 16,5) puis leur expression chute chez l'adulte (Fox, Lamperti et al. 1998; Sheen, Feng et al. 2002). Au sein du cortex, l'isoforme A est distribuée assez généralement alors que la FilamineB est davantage exprimée au niveau ventriculaire et sous ventriculaire (Sheen, Feng et al. 2002).

A un niveau cellulaire, on retrouve la FilamineA dans les neurones en migration et post-migratoires ainsi que dans les cellules gliales et les capillaires sanguins (Fox, Lamperti et al. 1998; Sarkisian, Bartley et al. 2008). Dans les précurseurs neuronaux en culture, l'expression des Filamines A et B est également plus importante que dans des neurones différenciés (Sheen, Feng et al. 2002).

La transition des cellules souches adultes en cellules progénitrices gliales peut être obtenue en culture, dans ce cas on parle de différenciation de CPMs en progéniteurs gliaux. Dans ce contexte, le laboratoire a cherché à identifier de nouveaux acteurs de cette différenciation par une approche transcriptomique comparative.

E.2 Résultats

E.2.1 Identification du gène FAM101A lors de la transition des progéniteurs multipotents en progéniteurs gliaux

L'établissement de cultures cellulaires de CPMs est primordial pour mieux comprendre la biologie et les fonctions de ces cellules. Les cultures primaires de CPMs sont réalisées à partir de cerveaux de rats nouveaux-nés. Les cellules mises en culture et maintenues en phase de prolifération par des cocktails de facteurs de croissances, bFGF (basic fibroblast growth factor, également nommé FGF2) et PDGF présentent la propriété remarquable de se diviser quasi indéfiniment sans montrer de signes de sénescence ni de transformation (Kondo and Raff 2000; Kondo and Raff 2004). Les CPMs se caractérisent par l'expression de l'antigène Nestine et l'antigène de surface NG2 (Reynolds and Weiss 1992; Balenci, Saoudi et al. 2007). Les CPMs peuvent être cultivées en neurosphères ou adhérentes sur substrat de Poly-L-lysine en présence de bFGF.

Sur Poly-L-lysine dans des conditions de prolifération, les cultures secondaires de CPMs forment un mélange hétérogène de CPMs et de cellules engagées dans le lignage glial. Les progéniteurs gliaux continuent d'exprimer le marqueur NG2 et expriment aussi l'antigène de surface A2B5 (Figure 28a). Une faible proportion des cellules expriment l'antigène de surface O4 et seront engagées dans le lignage oligodendrocytaire. Les trois populations cellulaires (NG2+, NG2+/A2B5+ et NG2-/A2B5+/O4+) peuvent être purifiées par tri cellulaire au FACS MoFlo sur la base de l'expression différentielle des marqueurs NG2, A2B5 et O4 (Figure 28b).

Dans le but d'identifier des gènes susceptibles de participer au processus de différenciation des CPMs en cellules gliales, une étude comparative différentielle des profils d'expression génique des CPMs et des progéniteurs gliaux a été réalisée sur puces oligonucléotidiques à haute densité (33 000 gènes) basées sur la technologie CodeLink (Collaboration avec Pr. J. Honnorat.). Pour obtenir des résultats significatifs d'un point de vue statistique et éliminer les variations aléatoires dans l'expression des gènes qui seraient dues aux conditions de manipulations, trois expériences indépendantes de tri cellulaire et d'hybridation ont été réalisées. Les résultats montrent une très grande reproductibilité pour les gènes présentant de fortes variations entre les trois populations cellulaires. Les résultats ont ensuite été confirmés sur un ensemble de six expériences indépendantes de tri cellulaire par RT-PCR quantitative (Figure 28c). Huit gènes sont fortement induits lors de la transition des CPMs en progéniteurs gliaux (x 20-50), parmi lesquels le gène FAM101A (Figure 28c). Deux autres gènes, *deltex1* et *p15^{INK4B}* codent pour des protéines déjà connues pour réguler la différenciation des CPOs.

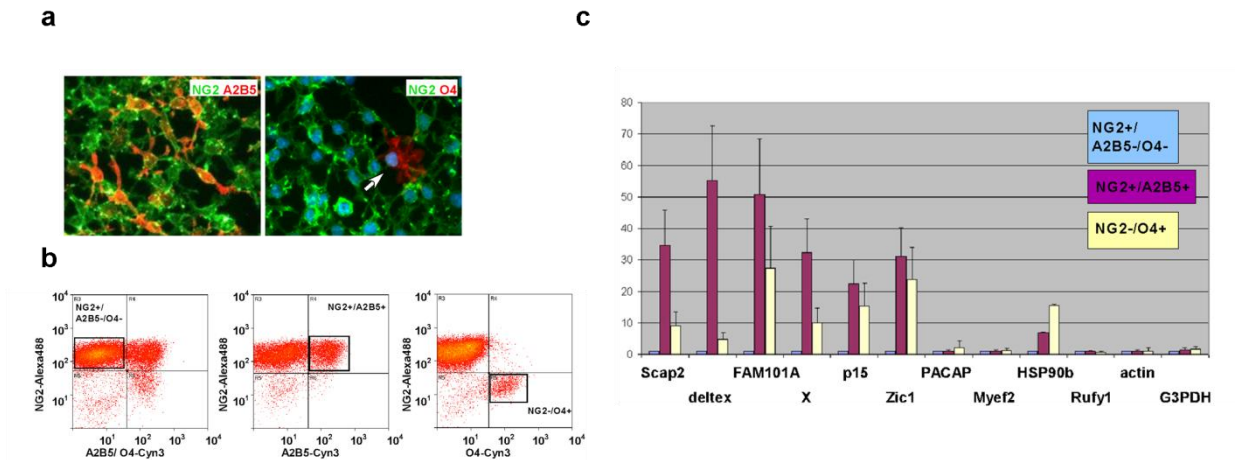


Figure 28: Identification du gène FAM101A codant pour la RefilineA exprimé lors de l'engagement de progéniteurs multipotents en CPOs.

a: les cultures à long terme de CPOs ont été doublement immunomarquées avec un anticorps de lapin contre la protéine NG2 et un second de souris contre A2B5 (panneau de gauche) ou contre O4 (panneau de droite). Les cultures sont composées d'une population mixte de précurseurs multipotents (NG2+/A2B5-), de CPOs en voies d'engagement (NG2+/A2B5+) et de CPOs engagés (NG2-/O4+).

b: les trois populations ont été séparées par cytométrie en flux pour analyses génomiques.

c: les six gènes les plus régulés sont représentés ici, ainsi que les gènes surexprimés uniquement dans la population de CPOs engagés (NG2-/O4+) et les gènes contrôles (actine et G3PDH).

E.2.2 Régulations différentes entre RefilineA et RefilineB

Nous avons complété l'étude transcriptomique en comparant les niveaux d'expression de RefilineA et de RefilineB (Figure 29). Nous avons alors constaté que la quantité d'ARN messager codant pour RefilineA augmente lors de la transition des CPMs en progéniteurs gliaux alors que la quantité de RefilineB reste stable (Figure 29a).

Des CPMs maintenues en neurosphères puis cultivées en conditions d'adhésion en présence de sérum de veau fœtal (SVF) 10% se différencient en astrocytes (25%), en oligodendrocytes (15%) et en neurones (3%) alors que les cellules restantes restent non-différenciées (Mokry, Karbanova et al. 2008). L'analyse protéique des cultures à différents temps de différenciation (0, 12 et 18 heures) montre que la quantité de RefilineA est relativement stable alors que celle de RefilineB augmente (Figure 29b).

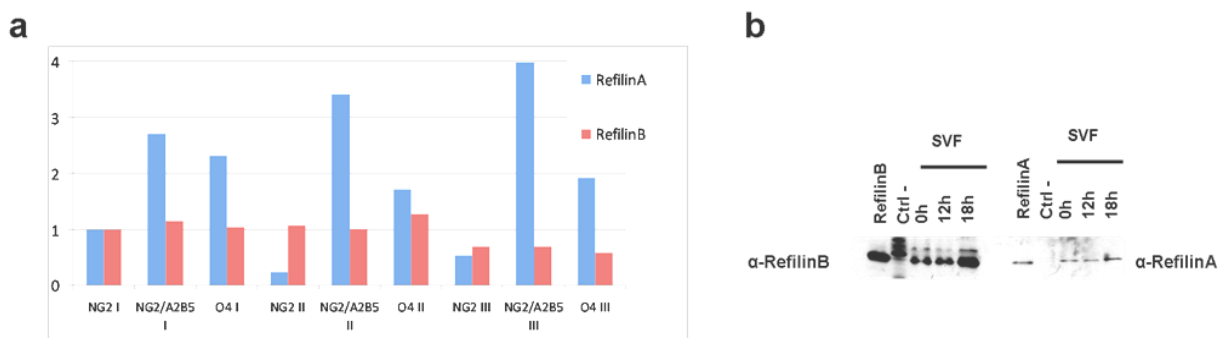


Figure 29: Régulations des ARN messagers et protéines de RefilineA et RefilineB dans les cellules progénitrices neurales.

a : Graphique représentant la quantité relative d'ARN messenger pour RefilineA (bleu) et RefilineB (rouge) dans trois populations différentes (NG2+, NG2+/A2B5+ et O4+). Trois expériences indépendantes (I, II et III) ont été effectuées. La valeur 1 a été arbitrairement attribuée à la population NG2+ de la première expérience (I) pour RefilineA et RefilineB et les valeurs des autres conditions ajustées par rapport à cette valeur de référence.

b : Les progéniteurs neuraux sont cultivés en conditions de neurosphères en milieu de prolifération supplémenté en bFGF (1µg/ml) (temps 0) puis en milieu de différenciation en présence de sérum de veau fœtal (10%) pour induire leur différenciation (temps 12 et 18 heures). Les cellules sont lysées après 0, 12 ou 18 heures et les extraits cellulaires totaux sont résolus sur un gel SDS-PAGE de 12% et analysés par Western blot avec un anticorps de poulet contre la RefilineA (α-RefilineA) ou un anticorps de cochon d'Inde contre RefilineB (α-RefilineB).

Ces observations suggèrent que RefilineA et RefilineB sont soumises à des mécanismes de régulation complexes et probablement différents au niveau transcriptionnel et protéique.

E.2.2.1 Les Refilines sont stabilisées en conditions de confluence

Nos travaux sur l'expression de RefilineB endogène dans les 3T3 ont montré une régulation de la quantité de protéine en fonction de la confluence (Figure 4a (Gay, Gilquin et al. 2011)). Nous avons donc voulu savoir s'il en était de même pour les protéines de fusion RefilineA-Myc et RefilineB-Myc exprimées de façon ectopique. Des cellules U373 MG transfectées avec les plasmides RefilineA-myc ou RefilineB-myc ont été cultivées en condition de sous-confluence, confluence et sur-confluence (cellules maintenues deux jours en culture après confluence), et les extraits cellulaires dosés puis analysés par Western blot (Figure 30). La quantité de RefilineA-myc augmente très significativement lorsque les cellules sont cultivées en conditions de confluence (Figure 30b). La bande correspondant à RefilineB-myc est également plus importante en condition de confluence qu'en condition de sous-confluence mais il ne semble pas y avoir de différences après le dépassement de la confluence.

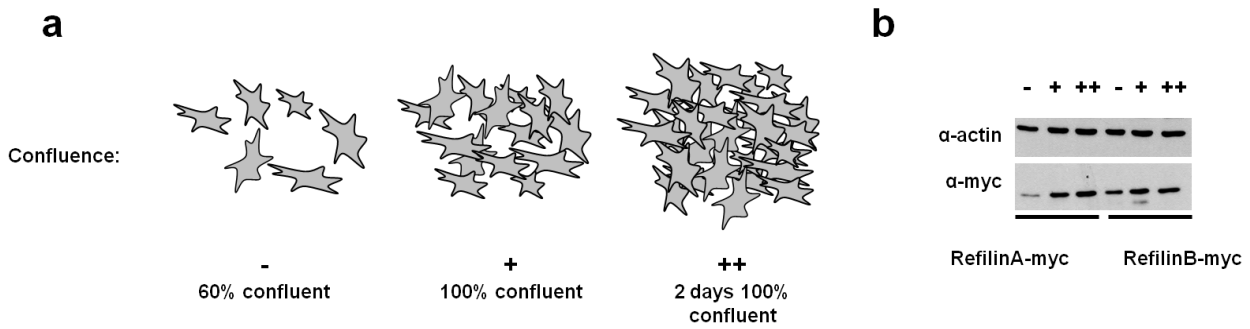


Figure 30: La quantité de RefilineA et RefilineB dépend de la confluence cellulaire.

a : Les cellules U373 MG ont été transfectées avec les protéines fusion RefilineA-myc ou RefilineB-myc puis chaque condition réensemencée dans trois boîtes de culture et lysée à différentes confluences : sous-confluence (-), confluence (+) et maintenues 2 jours à confluence (++).

b : Les extraits cellulaires ont été dosés et 6µg de protéines totales ont été déposés et résolus sur un gel SDS-PAGE de 12% et analysés par Western blot avec les anticorps de souris contre l'étiquette myc (α-myc) ou l'actine α (α-actin).

Ces observations confirment que RefilineA et RefilineB sont régulées par la densité cellulaire bien que la RefilineA semble beaucoup plus sensible à la confluence que RefilineB.

E.2.2.2 Les séquences PEST et DSG(X)_{2+n}S modifient la demi-vie des Refilines

Pour comprendre les différences dans la stabilité entre RefilineA et RefilineB, j'ai dans un premier temps comparé la structure primaire des deux protéines. J'ai remarqué qu'elle était caractérisée par la présence d'une séquence PEST qui est décrite comme responsable de la dégradation rapide des protéines (Rogers, Wells et al. 1986) (Figure 31a).

Par expression ectopique de RefilineA-myc et expérience de chasse à la cycloheximide et analyse par Western blot (Figure 31b gauche et quantification en c), j'ai pu observer que la demi-vie de la protéine était de l'ordre de 1 heure. J'ai ensuite montré que la délétion de sa séquence PEST est associée avec une augmentation de la demi-vie de la protéine par l'analyse du mutant dépourvu des 50 premiers acides-aminés dont la séquence PEST (Nter Δ50 RefilineA) (Figure 31b droite et quantification en c).

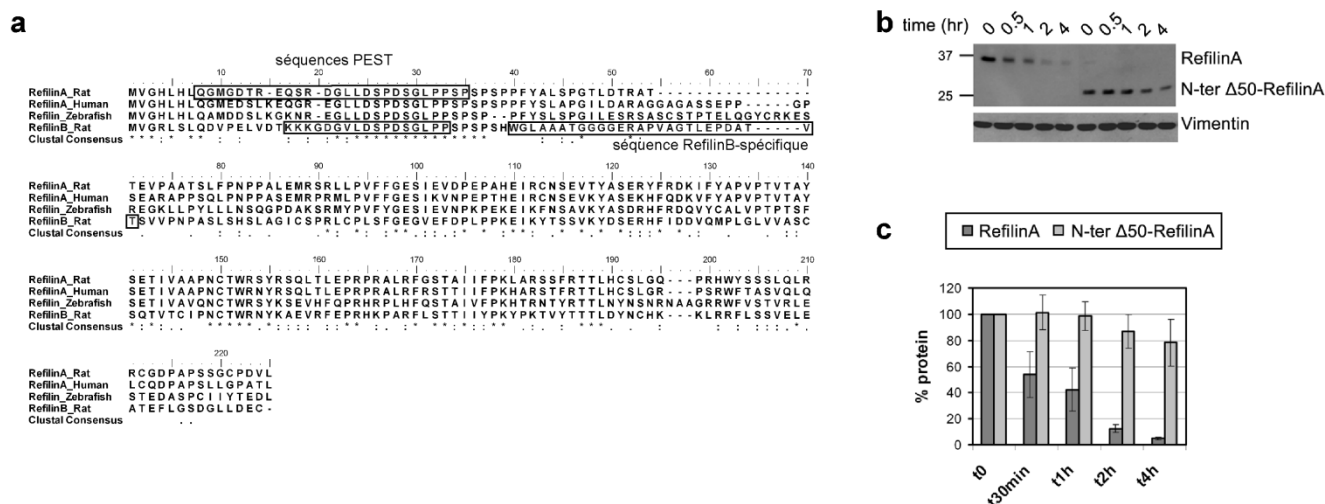


Figure 31 : Caractérisation des protéines Refline.

a: L'alignement de séquence de ReflineA de rat, d'humain et de poisson zèbre et de ReflineB de rat montre qu'il existe des motifs conservés, notamment la séquence PEST au sein de ReflineA et ReflineB et que ReflineB présente une séquence spécifique absente de ReflineA.

b-c: Analyse de la durée de vie de ReflineA entière et le mutant tronqué des 50 premiers acides aminés (N-ter Δ50-ReflineA), toutes deux étiquetées myc, par traitement à la cycloheximide (100μg/ml) dans les cellules U373. b : les extraits cellulaires sont analysés par Western blot en utilisant un anticorps de poulet contre ReflineA ou un anti-vimentin pour le contrôle de charge.

c : analyse quantitative des Western blots observés en b (deux expériences indépendantes de traitement à la cycloheximide).

La confirmation d'une différence majeure de la stabilité des protéines ReflineA et ReflineB à alors été obtenue lors de l'expression ectopique des protéines de fusion ReflineA-myc et ReflineB-myc dans les cellules U373 MG sous-confluentes. Tout d'abord, l'analyse par Western blot du niveau d'expression des protéines montre que la bande de ReflineA-Myc est difficilement détectable alors que celle de ReflineB-Myc est plus importante (Figure 32a, comparer lignes 2 et 4).

Contrairement à la ReflineA, la ReflineB est apparue beaucoup plus stable et la délétion de sa séquence PEST n'augmente pas significativement sa demi-vie protéique. L'analyse de la durée de vie de ReflineB, par expérience de chasse à la cycloheximide nous a alors permis de confirmer que ReflineA et ReflineB étaient soumises à des mécanismes de dégradation différents, la demi-vie de ReflineB-myc étant supérieure à 24 heures (Figure 32b gauche).

ReflineB possède en aval de sa séquence PEST une séquence spécifique absente chez ReflineA (Figure 31a) ; la séquence PEST pourrait être régulée de façon négative par une séquence adjacente qui agit par encombrement stérique pour inhiber la dégradation PEST-dépendante. Ce type de régulation à été décrit pour la protéine Ik-B (inhibitor of NF-κB).

Résultats

Cette séquence spécifique fonctionne en effet de façon négative pour la dégradation PEST-dépendante de RefilineB car la demi-vie de la protéine mutante RefilineB Δ Bspe-myc, dépourvue de cette séquence, est drastiquement diminuée par rapport à la protéine RefilineB-Myc sauvage (Figure 32b droite).

Au final, ceci suggère que le mécanisme de dégradation des Refilines est complexe et qu'il semble être régulé de façon différente pour RefilineA et RefilineB. RefilineA présente une demi-vie courte, en partie due à sa séquence PEST, alors que RefilineB est plus stable grâce à la présence d'une séquence RefilineB-spécifique en aval de la séquence PEST.

De plus, la courte durée de vie de RefilineA est unique parmi les régulateurs de l'actine jusqu'alors identifiés, ceci suggère que RefilineA pourrait avoir une fonction de régulation d'un phénomène hautement dynamique.

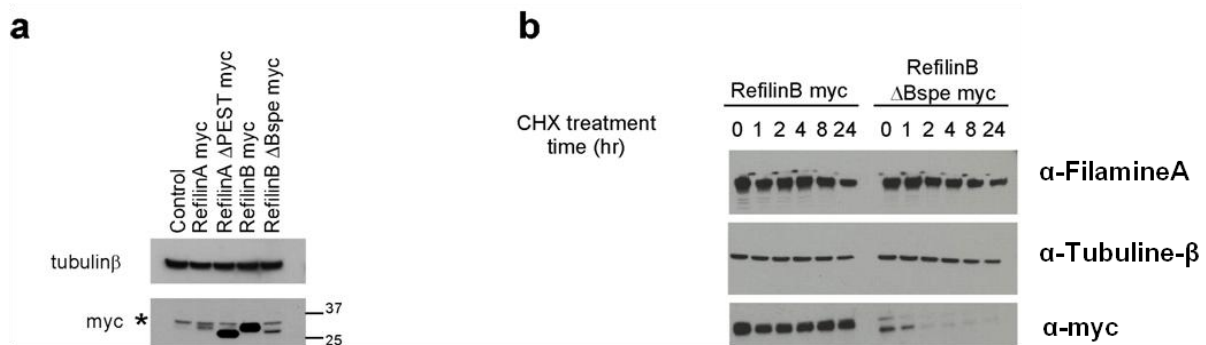


Figure 32: Régulations des durées de vie de RefilineA et RefilineB.

a : Les extraits cellulaires de U373 MG exprimant de façon ectopique RefilineA-myc, RefilineA Δ PEST-myc, RefilineB et RefilineB Δ Bspe-myc sont résolus sur un gel SDS-PAGE de 12% et analysés par Western blot avec des anticorps de souris contre l'étiquette myc. L'astérisque (*) indique la position d'une bande non-spécifique.

b : Analyse de chasse par cycloheximide (CHX, 100μg/ml) à différents temps (0, 1, 2, 4, 8 et 24 heures) des protéines RefilineA-myc, RefilineA Δ PEST-myc, RefilineB-myc et RefilineB Δ Bspe-myc exprimées dans les cellules U373 MG. Les extraits cellulaires ont été résolus sur un gel SDS-PAGE de 12% et analysés par Western blot avec des anticorps de souris contre l'étiquette myc (α -myc), la FilamineA (α -FilamineA) ou la Tubuline-β (α -Tubuline-β) comme contrôle de charge.

E.2.2.3 Le motif DSG(X)_{2+n}S de la RefilineB permet l'interaction avec β-Trecp

Nous avons vu que la protéine RefilineB est stabilisée dans les cellules NmuMG lors du traitement TGF-β (fig 5a (Gay, Gilquin et al. 2011)) et qu'elle possède un motif DSG(X)_{2+n}S. Pour

rappel, ce motif est présent au sein de protéines impliquées dans la signalisation de la TEM TGF- β -dépendante et constitue un signal de dégradation après reconnaissance par β -Trcp du motif DSG(X)_{2+n}S phosphorylé sur les sérines (Busino, Donzelli et al. 2003). Ainsi, nous avons donc recherché la possible interaction de β -Trcp et RefilineB, pour expliquer sa dégradation.

Par immunoprécipitation, nous avons observé que β -Trcp1 et RefilineB-myc interagissent quand exprimées de façon ectopique. Des substitutions des sérines en alanines au sein du motif DSG(X)_{2+n}S (mutant RefilineB S26AS29Amyc) qui empêchent la phosphorylation ont montré que les sérines du motif étaient nécessaires pour l'interaction avec β -Trcp1 (Figure 33).

Comme β -TrCP ubiquitine plusieurs substrats, il se peut qu'il y ait une compétition entre eux pour la quantité limitée de β -TrCP, ce qui expliquerait la faible bande observée dans l'immunoprécipitat de RefilineB-myc, comme déjà observé dans d'autres études (Fuchs, Spiegelman et al. 2004).

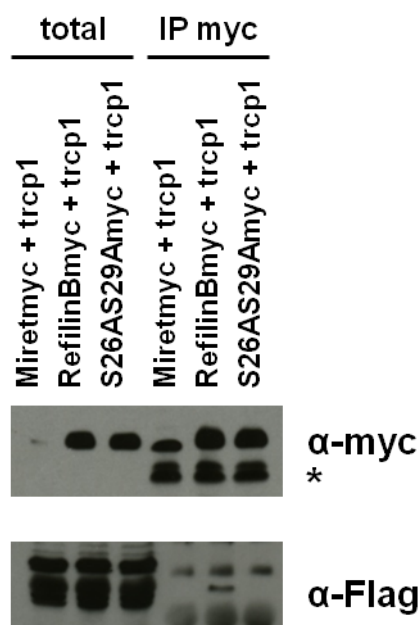


Figure 33 : Les sérines du motif DSG(X)_{2+n}S de RefilineB sont nécessaires pour sa liaison avec β -Trcp1.

Les cellules U373 MG ont été transfectées avec la protéine β -Trcp1 étiquetée Flag et une protéine contrôle (Miret), RefilineB ou le mutant RefilineB S26AS29A étiquetés myc. Après 3heures de traitement à l'inhibiteur du protéasome MG132 (5 μ M), l'interaction des protéines est observée par immunoprécipitation par un anticorps de souris contre myc. Les protéines totales (total) et les protéines immunoprécipitées (IP myc) ont été analysées par Western blot à l'aide d'anticorps de souris contre l'étiquette myc (α -myc) et contre l'étiquette Flag (α -Flag). L'astérisque (*) indique la position des chaînes légères de l'anticorps de souris contre myc utilisé pour l'immunoprécipitation.

E.2.3 Le complexe Refiline/Filamine est localisé sur une coiffe transitoire d'actine dans les précurseurs neuronaux lors de leur différenciation en culture

E.2.3.1 La coiffe d'actine composée du complexe RefilineB/FilamineA dans les précurseurs

Pour appréhender les fonctions du complexe Refiline/Filamine dans les cellules progénitrices neurales nous avons cultivé les CPMs en neurosphères et étudié la dynamique des réseaux d'actine et la localisation des protéines Filamine et RefilineB par immunocytochimie au cours de la différenciation en présence de SVF 10%.

En présence de SVF 10%, les CPMs cultivées en neurosphères migrent hors de la sphère et s'aplatissent (Figure 34a). Lors de la différenciation des neurosphères, on observe une réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation de câbles parallèles et périnucléaires d'actine au niveau apical pour les cellules qui quittent la sphère dès 4 heures et ce jusqu'à environ 15 heures (Figure 34b). La FilamineA et la RefilineB colocalisent sur les câbles périnucléaires d'actine, que nous supposons être l'équivalent des coiffes d'actine (Figure 34c).

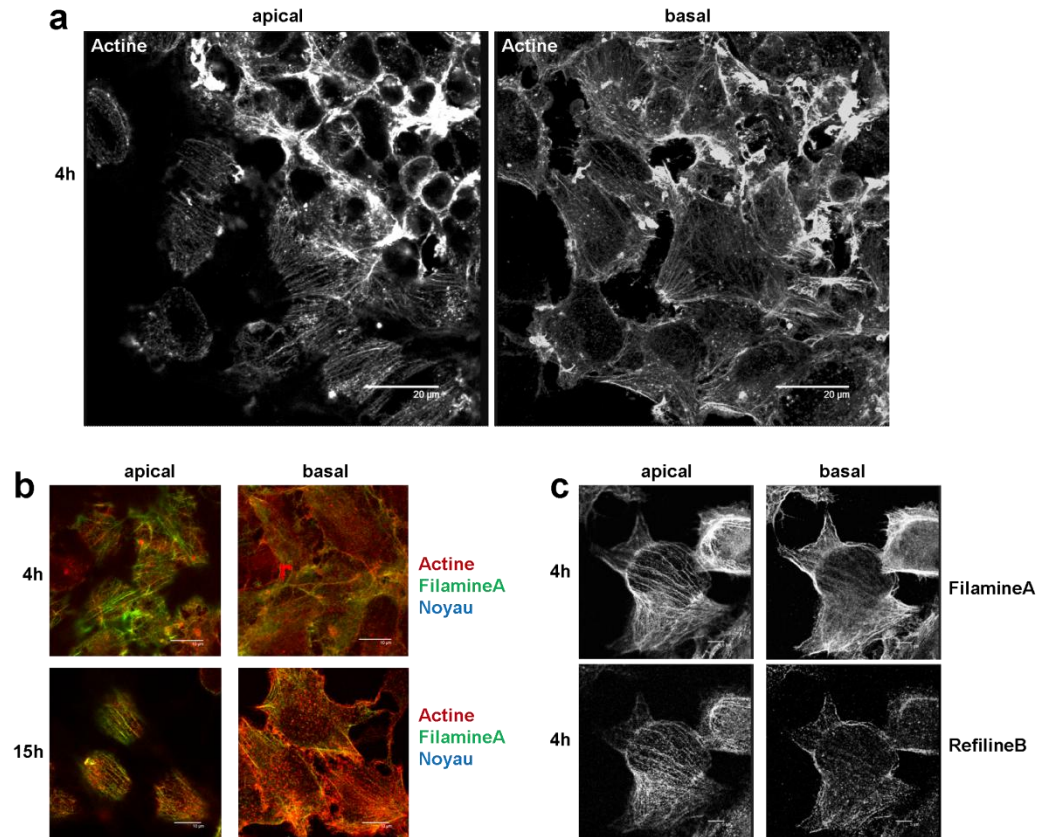


Figure 34: Les cellules progénitrices neurales possèdent des coiffes d'actine, de FilamineA et de RefilineB.

a-c : Les CPOs ont été maintenues en culture en neurosphères en présence de bFGF (1 $\mu\text{g/ml}$) puis SVF 10% pendant 4 (a-b) ou 15 heures (b).

a : Les cellules ont été fixées au PFA et immunomarquées à la phalloïdine complexée à l'Alexa 546. La sphère se situe en haut à droite du panneau et les cellules s'en échappent vers le bas à gauche

b : Les cellules ont été fixées au PFA après 4 ou 15 heures de différenciation et immunomarquées avec un anticorps de souris contre la FilamineA (vert) et marquées à la phalloïdine complexée à l'Alexa 546 (rouge) et avec le marqueur nucléaire Hoechst (bleu). Les images ont été obtenues par microscopie confocale et représentent des prises de vue apicales et basales.

Barre = 10 μm

c : Après 4 heures de différenciation, les cellules ont été fixées au méthanol et immunomarquées avec un anticorps de souris contre la FilamineA (panneau du haut) et un anticorps de cochon d'inde contre RefilineB (panneau du bas). Les images ont été obtenues par microscopie confocale et représentent des prises de vue apicales et basales.

Barre = 5 μm .

E.2.3.2 La coiffe d'actine des précurseurs neuraux est transitoire

Seules les cellules qui se détachent de la sphère présentent des coiffes (Figure 35, gauche) alors que les cellules des régions distantes en sont dépourvues. De plus, les coiffes disparaissent après une vingtaine d'heures pour toutes les cellules (Figure 35, droite). Cette observation illustre le caractère transitoire pour la formation des câbles périnucléaires d'actine.

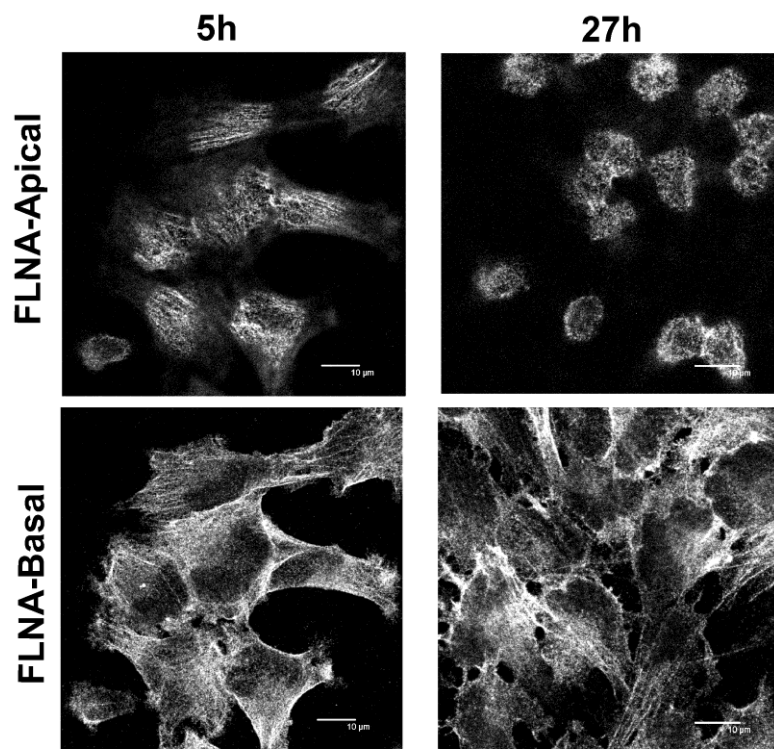


Figure 35: Les cellules progénitrices neurales possèdent des coiffes d'actine transitoires.

Les CPOs ont été maintenues en culture en neurosphères en présence de bFGF (1µg/ml) puis SVF 10% pendant 4 ou 27 heures. Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol et immunomarquées avec un anticorps de souris contre la FilamineA. Les images ont été obtenues par microscopie confocale et représentent des prises de vue apicales (panneau du haut) et basales (panneau du bas).

E.3 Discussion et perspectives

Nous avons identifié les Refilines lors de la différenciation des cellules progénitrices du système nerveux central adulte. Dans les cellules, les Refilines sont régulées de façon complexe par la présence d'une séquence PEST et d'un motif $DSG(X)_{2+n}S$. Dans les cellules progénitrices neurales multipotentes cultivées en neurosphères, la RefilineB se complexe à la FilamineA pour organiser une coiffe d'actine lorsque les cellules sortent des neurosphères.

Les différences observées au niveau transcriptionnel et sur la stabilité protéique des RefilineA et RefilineB suggèrent que ces protéines pourraient avoir des fonctions spécifiques et distinctes dans les cellules souches neurales. La production d'adénovirus recombinants pour les shRNA dirigés contre les protéines RefilineA et RefilineB devraient nous permettre d'aborder la question des fonctions de ces protéines dans les CPMs et lors de leur différenciation en cellules gliales.

Un deuxième aspect important concernant la biologie des protéines Refilines et qui demande à être mieux caractérisé porte sur les différents modes de stabilisation et de dégradation des isoformes.

Les Refilines sont soumises à une dégradation complexe. Dans le cas de la RefilineA nous avons muté les deux résidus Lysine de la protéine qui sont des sites potentiels d'ubiquitination. Ces mutations n'ont pas modifié la demi-vie de la protéine démontrant ainsi que la séquence PEST sur RefilineA ne cible pas un mode de dégradation ubiquitine-dépendant. Cependant, nous n'excluons pas qu'il existe une signalisation protéasome-dépendante pour l'isoforme RefilineB qui possède 10 lysines supplémentaires et un motif $DSG(X)_{2+n}S$ capable d'être reconnu par β -TrCP.

Il est à cet égard remarquable de constater que la dégradation de RefilineB présente des similitudes avec le facteur I- κ B (« inhibitor of NF- κ B ») qui retient NF- κ B « (nuclear factor- κ B ») dans le cytoplasme et bloque sa fonction de facteur de transcription. Pour sa translocation dans le noyau et l'activation de la transcription de gènes spécifiques, NF- κ B doit être sous forme libre, ce qui nécessite la dégradation de I- κ B. Pour ce faire, il existe deux types de dégradation : une ubiquitine-dépendante et une ubiquitine-indépendante. La première a lieu lorsque le facteur I- κ B est lié au dimère de NF- κ B, il sera alors phosphorylé par IKK (I- κ B kinase), ce qui conduira à sa reconnaissance par β -TrCP et sa dégradation par le protéasome (Spencer, Jiang et al. 1999; Winston, Strack et al. 1999). Lorsqu'il est libre, il est soumis à la dégradation ubiquitine-indépendante régulée par sa séquence PEST en région C-terminale (durée de demi-vie de 10 minutes) (Mathes, Wang et al. 2010). La liaison NF- κ B – I- κ B α masque le domaine PEST, ce qui induit la dégradation ubiquitine-dépendante par IKK (Mathes, O'Dea et al. 2008). De plus, on retrouve une hélice polyproline II (PPII) flexible au sein même de la séquence PEST de I- κ B α . Une telle séquence est responsable d'une conformation secondaire en hélice et corrèle avec la diminution de vitesse de dégradation d'I- κ B ; elle semble donc constituer un mécanisme supplémentaire de modulation de la stabilité de la protéine (Mathes, Wang et al. 2010).

Finalement, nous pensons que nos travaux sur le rôle du complexe Refiline/Filamine pourraient contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation de la migration des cellules souches des niches ventriculaires et sous-ventriculaires ; phénomène permettant leur différenciation en neurones et en cellules gliales. L'implication de la Filamine dans la migration des neuroblastes a été envisagée suite à la caractérisation du syndrome d'hétérotopie périventriculaire chez les femmes hétérozygotes porteuses d'une mutation sur le gène *FilamineA*. Cependant l'invalidation du gène *FilamineA* chez la souris n'a aucun impact sur la migration des cellules progénitrices neurales embryonnaires ni sur la migration des neuroblastes au cours de la neurogenèse. Nous pensons que le phénotype d'hétérotopie périventriculaire est spécifique aux cellules souches adultes des régions ventriculaires et sous-ventriculaires. Nous proposons donc maintenant de développer des études *in vivo* sur les fonctions du complexe Refiline/Filamine en ciblant plus particulièrement l'homéostasie des cellules souches présentes dans les niches chez l'adulte.

E.4 Matériel et méthodes

E.4.1 Culture de lignées cellulaires

Les cellules U373 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté de 10% de SVF.

E.4.2 Culture de cellules progénitrices neurales de rat

E.4.2.1 Obtention de culture de CPMs de rat à long terme

Les rats nouveaux-nés ont été tués par décapitation, les cerveaux ont été prélevés et les hémisphères isolés dans du PBS et 6% de glucose. Les cellules ont été ensuite dissociées dans 30U/ml de papaïne (Worthington), 0.24mg/ml de L-cystéine (Sigma), 40µg/ml de DNAase (Sigma) pendant une heure à 37°C. Les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans un milieu 'stop' : milieu Leibovitz's (L15, Gibco), 1mg/ml d'ovomucoïde (Worthington), 50µg/ml d'albumine bovine (bovine serum albumin, BSA, Gibco), DNAase). Après la centrifugation, les cellules ont été dissociées mécaniquement dans du L15 et 40µg/ml de DNAase et ensemencées sur des boîtes préalablement coatées à la poly-L-lysine (Sigma) dans un milieu DMEM-Glutamax à 4.5g/L de glucose (Invitrogen) + 10% sérum de veau fœtal (SVF). Après 10 jours, les CPMs ont été isolées de la microglie et des astrocytes par de successives étapes de agitation et cultivées dans du milieu de prolifération : milieu Neurobasal (Gibco), 2% du complément B27 (Invitrogen), 2mM de Glutamine (Gibco) supplémenté quotidiennement avec 1µg/ml de bFGF et 10ng/mL de PDGF.

Les cultures de CPMs à long terme sont obtenues après 3 mois de culture en milieu de prolifération en présence de 1µg/ml de bFGF et 10ng/mL de PDGF et en l'absence de sérum pour stimuler leur prolifération et inhiber leur différenciation (Kondo and Raff 2000; Tang, Tokumoto et al. 2000). Ces cultures sont composées d'un mélange de cellules précurseurs, caractérisées par l'expression du protéoglycane NG2, et de cellules engagées dans le lignage glial, exprimant le marqueur A2B5.

E.4.2.2 Prolifération des cultures de CPMs à long terme en conditions d'adhésion ou en neurosphères

Les CPMs peuvent être maintenues en condition d'adhésion sur substrat traité à la poly-L-lysine dans du milieu de prolifération supplémenté de 1µg/ml de bFGF et 10ng/mL de PDGF et présentent un phénotype multipotent dans de telles conditions (Kondo and Raff 2000; Kondo and Raff 2004).

Elles peuvent également être maintenues en suspension sous la forme d'amas de cellules et de matrice extracellulaire : les neurosphères, en présence de EGF (epidermal growth factor), bFGF ou les

deux (Reynolds and Weiss 1992; Chojnacki and Weiss 2008). Ces structures sphéroïdes sont hétérogènes, composées de cellules souches neurales et de progéniteurs et possèdent des propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence infinies et peuvent donner les trois types cellulaires (Palmer, Markakis et al. 1999; Dromard, Bartolami et al. 2007; Chojnacki and Weiss 2008; Chojnacki, Mak et al. 2009).

E.4.2.3 Différenciation des cultures de CPMs à long terme

Pour les cultures adhérentes ou après dissociation des neurosphères, la différenciation peut être induite en condition d'adhésion en présence de SVF. Dans de telles conditions, moins de la moitié des cellules se différencieront en astrocytes, le quart en oligodendrocytes (O4+ et/ou NG2+) et 3% en neurones alors que les cellules restantes seront non-différenciées (Mokry, Karbanova et al. 2008).

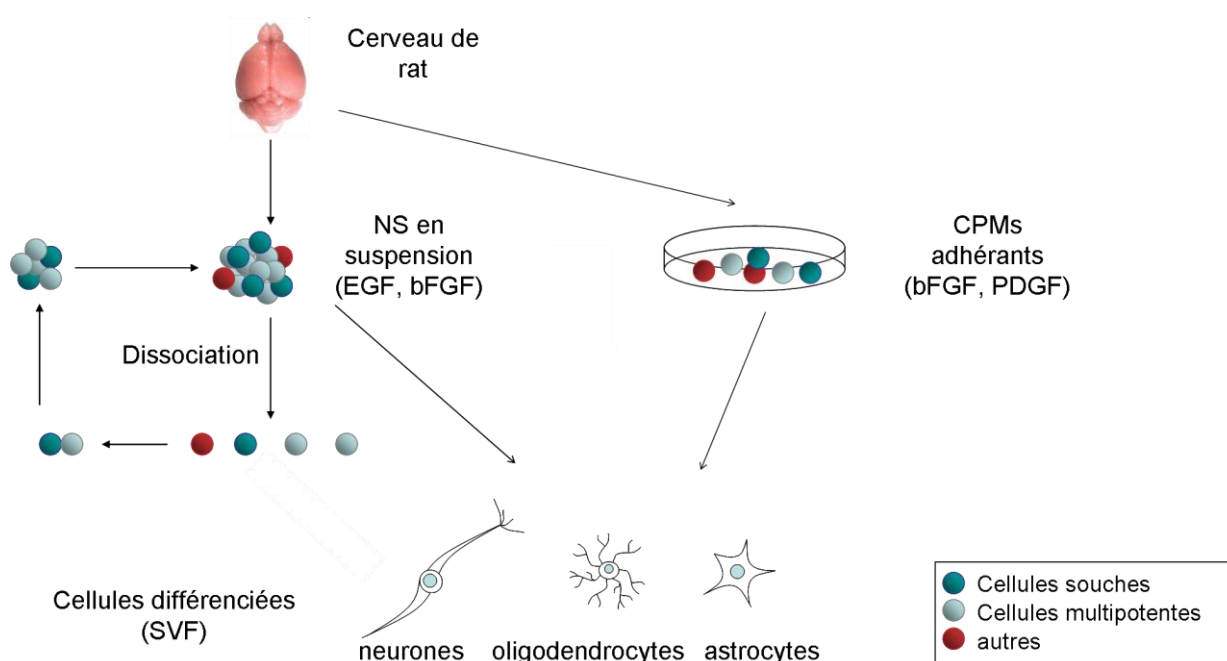


Figure 36: Culture de cellules progénitrices gliales de rat en neurosphères ou en conditions d'adhésion.

Les cellules progénitrices multipotentes (CPMs) de cerveaux de rat sont dissociées mécaniquement et enzymatiquement jusqu'à l'obtention de suspensions de cellules uniques et cultivées en présence de mitogènes bFGF/EGF. Après deux jours de culture, on obtient des grappes de cellules clonales indifférenciées : les neurosphères. Une neurosphère peut être dissociée et générer d'autres neurosphères en présence de mitogènes (capacité d'auto-renouvellement) ou se différencier avec du sérum de veau fœtal (SVF) en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (capacité de multipotence). On peut également cultiver les CPMs en condition d'adhésion en présence de bFGF/PDGF et les différencier avec du SVF.

D'après (Chojnacki, Mak et al. 2009).

E.4.3 Infection des CPM et U373 par adénovirus

Les particules d'adénovirus recombinants exprimant la GFP, RefilineA-GFP ou RefilineB-GFP ont été obtenues par Viraquest (North Liberty, Iowa). Les cellules ont étéensemencées à une densité de 3×10^4 cellules/cm² sur des lamelles de verre traitées à la poly-lysine le jour précédant l'infection. Les cellules U373 ou CPMs ont ensuite été incubées avec 15 ou 150 MOI (Multiplicity of Infection) de particules virales, respectivement, dans un volume minimal de culture pendant 4 heures puis complété avec du milieu frais et incubées pendant la nuit. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du milieu frais sans pénicilline/streptomycine.

E.4.4 Infection des cellules U373 MG par lentivirus et lignée stable

Les particules lentivirales exprimant l'ARN interférent contre la FilamineA (shRNA FilamineA) ou contrôle (shRNA control) ont été obtenues par Sigma (MISSION particules). Les cellules ont étéensemencées à une densité de 3×10^4 cellules/cm² sur des boîtes de 60 mm puis incubées avec 15 MOI (Multiplicity of Infection) de particules virales et du polybrene (8 µg/ml), dans un volume minimal de culture pendant 4 heures puis complété avec du milieu frais et incubées pendant la nuit. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du milieu frais sans pénicilline/streptomycine. Le jour suivant, les cellules ont été sélectionnées à la puromycine (0,5µg/ml) et le traitement maintenu le long de l'étude. L'inhibition d'expression a été évaluée par Western blot et immunofluorescence et estimée à 70%.

E.4.5 Immunofluorescence

Les cellules U373 ont été cultivées à une densité de 3×10^4 cellules/cm² sur des lamelles de verre traitées à la poly-Lysine, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du PBS et perméabilisées avec du Triton X-100 0.2%. Les cellules ont ensuite été incubées avec du tampon de saturation (5% sérum de chèvre-TBS) puis avec les anticorps primaires sur la nuit à 4°C, lavées au TBS et marquées avec l'anticorps secondaire approprié.

Les images ont été obtenues avec un microscope Zeiss (Axiovert 200M) ou confocal Leica (TCS SP2). Les fluorescences Hoescht, Alexa488, Cyanine3 (Cy3) et Cyanin5 (Cy5) ont été excitées et collectées séquentiellement (400 Hz ligne par ligne).

E.4.6 Immunoprécipitation

Les cellules cultivées dans des boîtes de 100mm ont été transfectées avec 6µg du plasmide approprié grâce à la Lipofectamine2000 (Invitrogen). Après 18 heures, les cellules ont été lysées dans 500µl de tampon de lyse (40mM tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.3% Triton X100, 4mM EDTA, 4mM

EGTA) supplémenté avec un cocktail d'anti-protéases et d'anti-phosphatases. Des billes Protéine G Sépharose (Sigma) couplées à des anticorps de souris contre l'étiquette myc ont été incubées avec le lysat pendant 2 heures à 4°C. Les précipitats ont ensuite été lavés 4 fois dans du tampon de lyse, solubilisés dans du tampon SDS, fractionnés par SDS-PAGE et analysés par Western blot.

E.4.7 Expériences de stabilité des Refilines

Les cellules U373, cultivées en condition de quasi-confluence, exprimant soit les protéines de fusion RefilineA-myc, RefilineA Δ PEST-myc, RefilineB-myc ou RefilineB Δ Bspe-myc ont été traitées avec 100µg/ml de cycloheximide (CHX, Sigma) pour inhiber la traduction protéique. A différents temps, les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse supplémenté avec un cocktail d'anti-protéases et d'anti-phosphatases. Quinze microgrammes d'extrait protéique total ont été fractionnés par SDS-PAGE et analysés par Western blot avec les anticorps appropriés.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales et perspectives

F. Le complexe Refiline/Filamine réorganise l'actine et génère des coiffes

Mes travaux de thèse ont permis d'identifier une nouvelle famille de protéines, les Refilines, dans le contexte de réorganisations de l'actine, notamment la formation de la coiffe d'actine.

Ceci nous montre que les fonctions de la Filamine peuvent être modulées par son interaction avec les Refilines et que ceci lui procure un nouveau rôle : celui d'inducteur de coiffes d'actine. Nous pouvons faire l'hypothèse d'un modèle où l'interaction de la Refiline sur la Filamine induirait un changement dans sa conformation au niveau des domaines 19, 20, 21 (Figure 37 a-c) (Lad, Kiema et al. 2007). Comme les Refilines interagissent avec le domaine 21 et celui-ci est situé entre les domaines 19 et 20, s'ensuivrait un changement dans l'organisation des fibres d'actine ce qui modulerait sa fonction.

De plus, ces travaux ont apporté une nouvelle dimension à la compréhension des coiffes d'actine par l'identification de deux nouveaux membres venant s'ajouter aux protéines du complexe LINC. Le complexe Refiline/Filamine pourrait interagir avec des composés du complexe LINC, ou bien une protéine pour l'instant non identifiée, et permettre aux fibres d'actine de s'ancrer au dessus du noyau et former la coiffe d'actine (Figure 37 d).

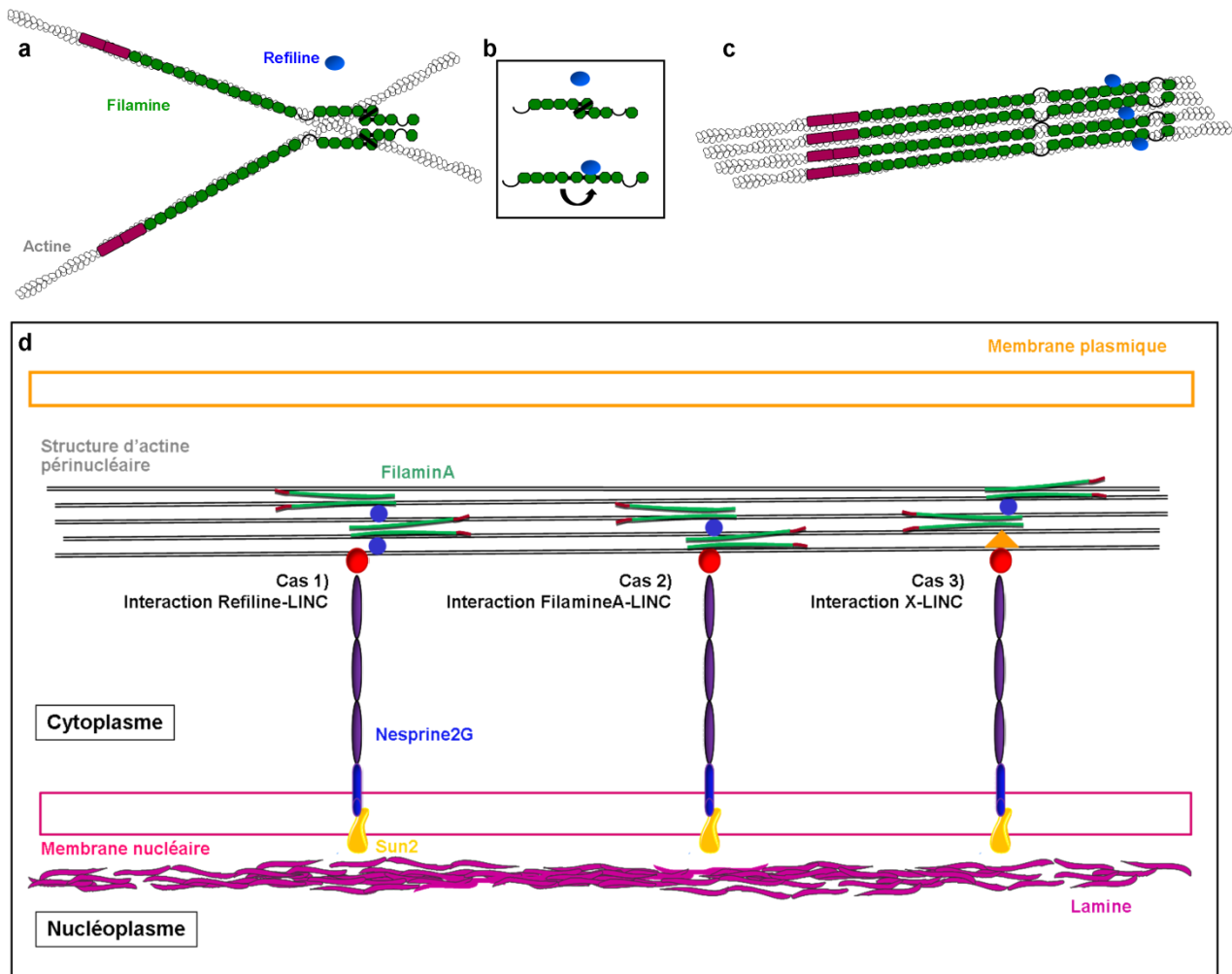


Figure 37: Le complexe Refiline/Filamine organise les réseaux d'actine en fibres parallèles pour former les coiffes d'actine.

Schématisation du potentiel mode d'action de la Refiline sur la Filamine pour changer sa fonction d'organisatrice de réseau à organisatrice de fibres.

a : Par sa forme en V, la Filamine (vert) organise l'actine en réseau. Les domaines 19-20 et 21 adoptent une organisation particulière où le domaine 21 est situé entre le 19 et le 20.

b : L'interaction de Refiline (bleu) sur le domaine 21 induit un changement dans la conformation des domaines 19, 20 et 21.

c : Une fois la conformation de la Filamine modifiée, elle organisera l'actine en fibres.

d : Le complexe Refiline/Filamine est localisé en région périnucléaire par son association avec un composé du complexe LINC par la Refiline (cas 1), la Filamine (cas 2) ou une protéine X pour l'instant non identifiée (triangle orange, cas 3). Ceci induit la formation de fibres au dessus du noyau.

G. La régulation complexe de la protéine Refiline

Nous avons vu que les protéines Refilines sont toutes deux soumises à une régulation complexe et que chaque membre possède sa propre régulation. Leurs séquences particulières, motifs PEST et DSG(X)_{2+n}S, ainsi que l'interaction avec leur unique partenaire à ce jour identifié, la Filamine, et les conditions de culture à confluence sont autant de paramètres qui rendent compte de la complexité de la stabilité des Refilines.

Leur courte durée de vie et expression transitoire leur permettent d’agir comme des interrupteurs moléculaires pour générer de nouvelles structures d’actine pour répondre aux besoins immédiats de la cellule. Les modes de régulation différents entre les deux membres suggèrent que ces protéines pourraient avoir des fonctions spécifiques et distinctes.

Mes travaux ont mis en évidence leurs fonctions lors des phénomènes de transition où RefilineA est impliquée dans le processus de différenciation des cellules souches neurales alors que RefilineB est régulée lors des changements morphologiques de la TEM. Plusieurs hypothèses sur l’implication des coiffes d’actine composées du complexe Refiline/Filamine lors des phénomènes de transition cellulaire peuvent être envisagées.

H. Rôle fonctionnel potentiel du complexe Refiline/Filamine dans l’établissement des coiffes lors des phénomènes de transition

Mes résultats pourraient permettre de mieux comprendre les fonctions des réseaux périnucléaires d’actine dans les mécanismes de mécanotransduction du noyau lors de programmes de transition.

H.1 Lors de l’étape d’initiation de migration : la polarisation

Le réseau d’actine périnucléaire est responsable du positionnement actif du noyau à l’arrière du centrosome lors de la polarisation des fibroblastes 3T3, étape nécessaire pour l’initiation de la migration. Ce positionnement est le résultat de deux voies de régulation distinctes : 1) le maintien du positionnement du centrosome par le réseau microtubulaire et les protéines dynéine, notamment, et 2) le mouvement rétrograde de l’actine par la Myosine (Figure 38) (Gomes, Jani et al. 2005). Ce réseau périnucléaire d’actine se lie à la ligne TAN permettant son ancrage au noyau, pour permettre son déplacement (Luxton, Gomes et al. 2010).

Nous pouvons imaginer qu’un système semblable soit requis lors de la migration des CPMs hors des neurosphères lors de la différenciation en progéniteurs gliaux ; ceci expliquerait la présence des coiffes transitoires d’actine.

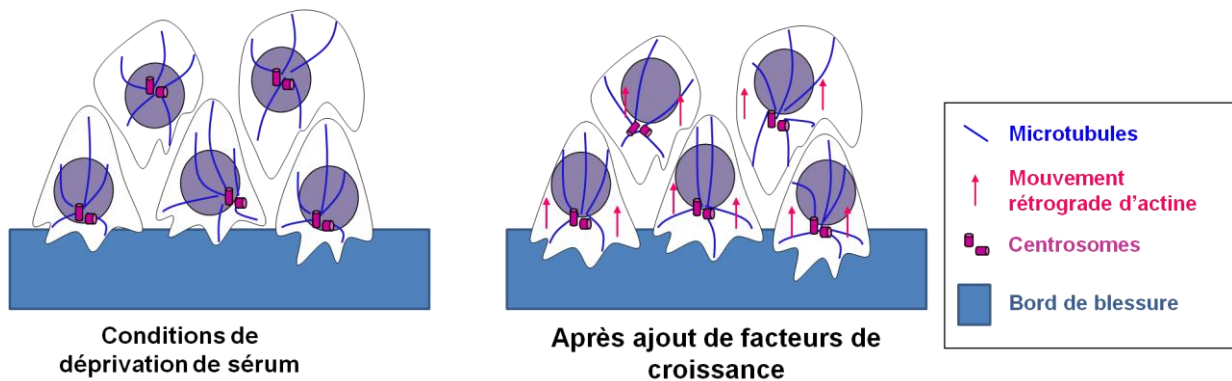


Figure 38: Représentation schématique des mouvements nucléaires lors de la polarisation des fibroblastes 3T3.

Les cellules NIH 3T3 se positionnent au bord de la blessure avant la migration. Lors de l'ajout de facteurs de croissance, le noyau s'éloigne du bord par mouvement rétrograde d'actine (flèche rose) alors que les centrosomes (violet) et les microtubules (bleu) restent immobiles dans la cellule. Ainsi, le noyau se trouve à l'arrière des centrosomes dans des cellules polarisées.

D'après (Starr 2009).

H.2 Lors de la transition épithélio-mésenchymateuse

Lors de la TEM, le cytosquelette des cellules épithéliales va subir d'importantes réorganisations avec la formation de fibres de stress et la perte de l'organisation corticale. Récemment, l'implication des Filamines dans l'établissement des structures épithéliales a été étudiée dans les cellules MDCK (« Madin Darby Canine Kidney ») n'exprimant plus de FilamineB car sont incapables de former des acini et présentent des défauts de localisation des protéines de jonction (Wakamatsu, Sakai et al. 2011). Ainsi, les Filamines sont requises pour l'intégrité des cellules épithéliales et leur régulation, par leur relocalisation notamment, serait un élément essentiel pour moduler leur fonction. Les Filamines sont aussi des protéines essentielles pour les dynamiques des adhésions focales qui ancrent les fibres de stress dans les cellules de type fibroblastique. La présence transitoire des Refilines permettrait de réorienter la Filamine vers une fonction particulière, des jonctions cellulaires aux jonctions avec la matrice.

Dans les cellules épithéliales humaines MCF-10A, une coiffe d'actine est sous la forme d'un réseau réticulé (Khatau, Kim et al. 2010), alors qu'elle est sous la forme d'un réseau parallèle dans les cellules fibroblastiques (Khatau, Hale et al. 2009). Elle va donc subir une réorganisation lors de la TEM et par mon travail de thèse je propose que l'expression transitoire de RefilineB et sa liaison avec la FilamineA participent à la réorganisation de la coiffe d'actine lors de ce processus.

H.3 Lors de la différenciation des cellules souches neurales

Au cours du développement, les phénomènes de mouvement nucléaire dépendant du complexe LINC, tels que la migration cellulaire ou le mouvement nucléaire au sein de la cellule, sont essentiels lors de la mise en place du cerveau.

Lors de la migration cellulaire, les neurones présentent une morphologie unipolaire et étendent un prolongement précédé par un cône de croissance qui explore l'environnement, en s'étendant et se rétractant (Lowery and Van Vactor 2009). Suite à l'immobilisation de la protrusion et la consolidation de son ancrage, le noyau sera transloqué vers l'avant par nucléokinèse (Ayala, Shu et al. 2007). En bref, les centrosomes avancent dans un gonflement du bord avant, ce qui permet d'exercer une force de traction pour déplacer le noyau vers l'avant de la cellule via le réseau de microtubules (Figure 39) (Tseng, An et al. 2004). Ce phénomène requiert le complexe LINC et l'absence de certains composés, tels que LIS1 et la lamineB2, induit des défauts de nucléokinèse et de migration des neurones corticaux, respectivement (Tanaka, Serneo et al. 2004; Coffinier, Fong et al. 2010)

La contraction du complexe acto-myosine joue également un rôle prépondérant dans la migration pour le mouvement nucléaire saltatoire ainsi que le détachement de la traine de la matrice extracellulaire (Bellion, Baudoin et al. 2005; Schaar and McConnell 2005; Tsai, Bremner et al. 2007). Dans les neurones en migration, le complexe d'acto-Myosine tracte le centrosome et le noyaux dans la protrusion avant (Solecki, Trivedi et al. 2009). Les études murines révèlent l'importance de ce phénomène car des défauts de Myosine II non-musculaire sont à l'origine de sévères défauts dans l'architecture du cerveau et dans la migration neuronale (Tullio, Bridgman et al. 2001; Ma, Kawamoto et al. 2004).

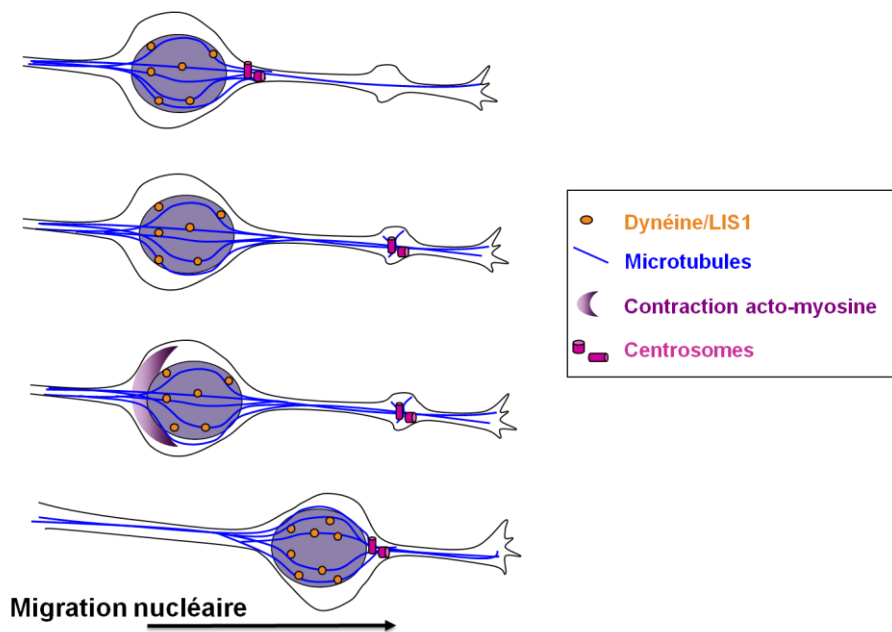


Figure 39 : Représentation schématique des mouvements nucléaires dans les précurseurs neuronaux.

Dans les précurseurs neuronaux, le centrosome migre en avant de façon constante dans le gonflement puis les microtubules exercent une force de traction sur le noyau qui se déplace vers l'avant. La poussée d'acto-myosine (violet) à l'arrière du noyau participe également à ce mouvement.

D'après (Starr 2009).

D'autre part, les cellules neuroépithéliales et de la glie radiaire subissent un mouvement nucléaire de va-et-vient entre les surfaces apicale et basale à chaque cycle cellulaire, bien que les cellules restent immobiles. Ce mouvement, nommé « migration nucléaire intercinétique », est nécessaire pour la bonne mise en place des couches du cerveau (Gotz and Huttner 2005; Zhang, Lei et al. 2009; Taverna and Huttner 2010). Il requiert le complexe LINC où les microtubules permettent de déplacer le noyau tel un cargo (Tsai, Lian et al. 2010). D'autres études impliquent le cytosquelette d'actine dans les cellules de la rétine du poisson-zèbre et les hémisphères de souris en culture (Norden, Young et al. 2009; Schenk, Wilsch-Brauninger et al. 2009). Les observations contradictoires témoignent de la complexité du phénomène et la compréhension de ces mécanismes reste encore à approfondir (Figure 40) (Tanaka, Serneo et al. 2004; Tsai, Chen et al. 2005; Zhang, Lei et al. 2009).

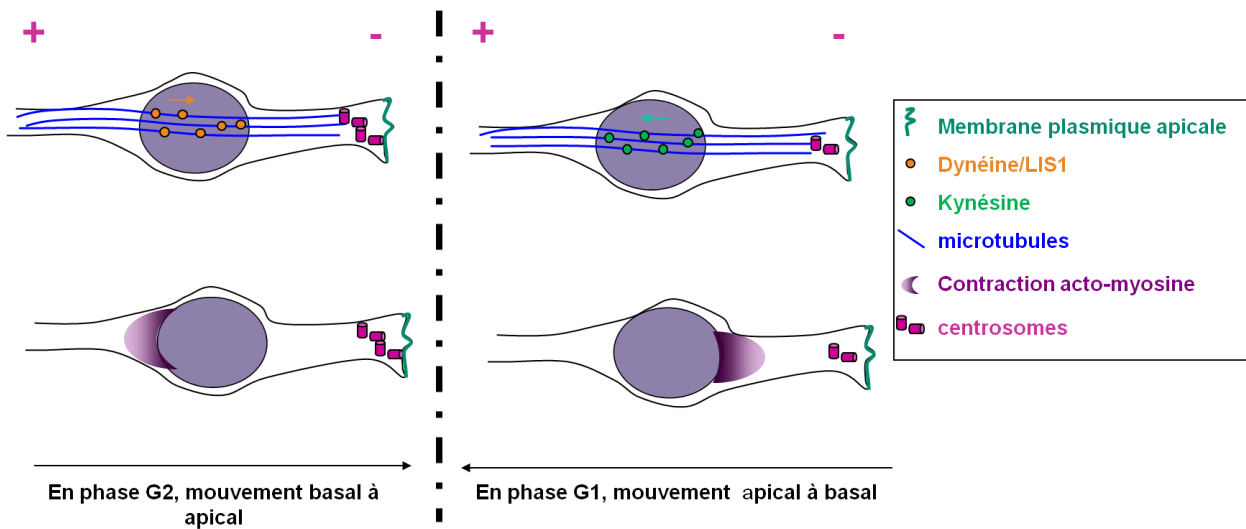


Figure 40: Schéma de la migration nucléaire intercinétique dans les précurseurs neuronaux.

Panneau de gauche : Lors du mouvement basal à apical, le noyau est ancré au réseau de microtubules via les protéines dynéine et LIS1 (orange) liées à la Nesprine-2 et glisse le long des microtubules en direction du pôle - où se trouve le centrosome.

Panneau de droite : Lors du mouvement apical à basal, les protéines kinésine et LIS1 (vert) liées à la Nesprine-2 permettent le mouvement nucléaire.

Dans les deux cas, la poussée d'acto-myosine (violet) à l'arrière du noyau participe également au mouvement nucléaire.

D'après (Taverna and Huttner 2010).

Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires et l'identification des régulateurs de ces phénomènes migratoires impliquant le noyau et le complexe LINC sont encore à découvrir. Il serait maintenant important d'identifier la potentielle implication du complexe Refiline/Filamine dans de tels mouvements nucléaires lors de la mise en place du cerveau et lors des processus de migration cellulaire chez l'adulte.

TABLEAUX ANNEXES

Tableaux annexes

Tableau XIII : Protéines se liant à l'actine.

	Famille de protéines	Fonction biochimique
Facteurs de nucléation	Formines	s'associent au bout barbé pour la nucléation
	Spirs	permet la nucléation de filaments non-branchés
	Arp2/3	génère de nouveaux filaments à partir de filaments existants (branche à 70°)
Facteurs régulant Arp2/3	Cortactine	se lie à l'actine F et active/ module le complexe Arp2/3
	famille SCAR/WAVE	active le complexe Arp2/3
	famille WASP	active le complexe Arp2/3
Protéines se liant à l'actine globulaire	Cap/Srv2	recycle les monomères d'actine
	Cofiline	permet l'ajout de monomères d'actine au bout barbé
	thymosine β -4	séquestre l'actine G
	Verpoline/WIP	se lie à l'actine G et à WASP
Protéines se liant à l'actine en filaments	famille Ena/VASP	rôle antagoniste à CapZ à l'extrémité des filaments, recrute la profiline
	Tropomyosine/troponine	se lie le long des filaments et les stabilise
	Nebuline	se lie le long des filaments, les stabilise et détermine leur longueur
Protéines de coiffe des bouts pointus	Tropomoduline/Tmod	coiffe le bout pointu
Protéines de coiffe des bouts barbés	CapZ/capping protein/ β -actinine	s'organise en hétérodimère et coiffe le bout barbé
	Gelsoline	
	Tensine	
Protéines de dépolymérisation et de cassage	ADF/Cofiline	désassemble les filaments d'actine se lie à l'actine-GDP et induit sa dissociation à l'extrémité (-)
	superfamille des gelsoline/villine	casse les filaments d'actine

Protéines organisatrice en fagots ou réseaux	spectrine	organise les filaments en réseaux orthogonaux lâches
	Fimbrine/Plastine	organise les filaments en fagots parallèles
	α-actinine	organise les filaments en fagots peu compacts
	Filamine	organise les filaments en réseaux orthogonaux
Protéines d'association à la membrane plasmique	Anilline	
	Annexine	
	ERM	
	Spectrine	
Protéines de jonction cellule-cellule	α-caténine	
	ZO-1	
Protéines de jonction avec la matrice extra-cellulaire	Dystrophine/Utrophine	
	Palladine	
	Plakine	
	Taline	
	Vinculine	
	Zyxine/Paxilline	
	Filamine	
Protéines moteur et régulateurs	Calponine	
	famille des Myosines	
	Tropomyosine/Troponine	

D'après (Siripala and Welch 2007; Siripala and Welch 2007; Alberts, Wilson et al. 2008).

Tableau XIV: Protéines se liant aux Filamines.

Fonction de l'interactant	Interactant	Site d'interaction sur la FilamineA (ou FilaminB ou C)	Importance	Référence
Cytosquelette	Actine F	ABD, tige 1	La FilamineA organise les filaments d'actine en réseau orthogonal	
	Vimentine	Domaines 1–8	L'expression des domaines 1-8 est nécessaire à l'étalement cellulaire par la phosphorylation de la vimentine et l'expression de l'intégrine-β1	(Kim, Nakamura et al. 2010)
Petites GTPases et régulateurs	Trio	Domaines 23–24	Trio est une GEF (guanine nucleotide exchange factor) qui active RhoG, Rac1 et RhoA, par l'échange de GDP en GTP. Trio induit la formation de vagues via la FilamineA.	(Bellanger, Astier et al. 2000)
	FilGAP	Domaine 23 (spécifique de l'isoforme A)	FilGAP est une GAP (GTPase-activating protein) spécifique de Rac. L'interaction FilGAP-FilamineA stimule l'activité GAP et empêche l'étalement cellulaire.	(Ohta, Hartwig et al. 2006; Nakamura, Heikkinen et al. 2009)
	Rho	Domaine 24	Remodelage du cytosquelette	(Ohta, Suzuki et al. 1999)
	Rac	Domaine 24 (et domaines 20–21 pour FilamineB)	Remodelage du cytosquelette	(Ohta, Suzuki et al. 1999)
	Cdc42	Domaine 24	Remodelage du cytosquelette	(Ohta, Suzuki et al. 1999)
	RalA	Domaine 24 et tige 2	Formation de filopodes	(Ohta, Suzuki et al. 1999)
Petites GTPases et régulateurs	P190RhoGAP	?	Dans des cellules rondes, p190RhoGAP interagit avec la FilamineA et ne peut pas être localisé aux rafts lipidiques, Rho est active. Lors de l'étalement, l'activité Rho est bloquée par p190RhoGA suite à une perte d'interaction avec la FilamineA (clivage par la calpaine ?)	(Mammoto, Huang et al. 2007)
Kinase	ROCK	Domaine 24	ROCK (Rho kinase) est un effecteur de Rho et co-localise avec la FilamineA aux protrusions membranaires.	(Ueda, Ohta et al. 2003)

Protéine transmembranaire	GPI α (CD42b)	Domaine 17 (aussi pour FilamineB)	L'interaction GPI α -FilamineA est nécessaire pour l'activation des plaquettes.	(Nakamura, Pudas et al. 2006)
Protéine transmembranaire	Integrine β	Domaines 21 (pour FilamineA/B/C)	La FilamineA est un régulateur négatif de l'adhésion par les intégrines	(Kiema, Lad et al. 2006)
Protéine transmembranaire	CEACAM1 (CD66a)	Domaines 23–24 de FilamineA	Réduit la migration cellulaire	(Klaile, Muller et al. 2005)
	Calmodulin	ABD	Régule l'interaction avec l'actine F <i>in vitro</i>	(Nakamura, Hartwig et al. 2005)
	FILIP	Domaines 5–18	Dégrade la FilamineA et bloque la migration des précurseurs neuronaux	(Nagano, Yoneda et al. 2002)
	Migfilin (FBLP-1)	Domaine 21 (FilamineA/B/C) et 10–13 (FilamineB)	Empêche l'interaction FilamineA-Intégrine permettant l'interaction Taline-Intégrine et donc l'activation des Intégrines	(Takafuta, Saeki et al. 2003; Tu, Wu et al. 2003; Lad, Jiang et al. 2008; Ithychanda, Das et al. 2009)
	IKAP (ELP1)	?	IKAP interagit avec la FilamineA et permet sa localisation dans les protrusions membranaires	(Johansen, Naumanen et al. 2008)
Signalisation	MKK4(SEK1/MEK4/MAPK K)/7 β , γ	Domaines 20-21 (FilamineB) et 21- 22 (FilamineA/B/C)	Interagit avec la FilamineA pour la signalisation MEKK4 (MEKK4 induit une diminution d'expression des FilamineA et B)	(Sarkisian, Bartley et al. 2006) (Nakagawa, Sugahara et al. 2010)
Signalisation	β -arrestine	Domaine 22	Interagit avec la FilamineA pour la signalisation ERK et la réorganisation du cytosquelette	(Scott, Pierotti et al. 2006)
Kinase	PKA	?	Phosphoryle S2152 du domaine 20	(Jay, Garcia et al. 2004)
Kinase	PAK1	Domaine 23	Phosphoryle la FilamineA sur la sérine 2152, son activité kinase est FilamineA-dépendante	(Gorlin, Yamin et al. 1990)
Kinase	RSK	?	Phosphoryle la FilamineA sur S2152 (pas FilamineB)	(Woo, Ohta et al. 2004)
	SHIP-2	Domaines 22-24 (pour FilamineA/B/C)	Colocalise avec la FilamineC sur les lignes Z et le sarcolemme et avec les FilamineA et B au vagues membranaires	(Dyson, O'Malley et al. 2001)
Phosphatase	Calcineurine	?	Déphosphoryle la phospho-S2152	(Seo 2008)
Phosphatase	Cycline B1/Cdk1	Domaine 9	Phosphoryle la sérine1436 de la FilamineA et la dissocie de l'actine F	(Nakamura, Osborn et al. 2007)

Phosphatase	Cycline D1/Cdk4	Phospho-FilamineA sur sérine S2152	La depletion la Cycline D1 réduit la migration des cellules mammaires cancéreuses MDA-MB-231 et la phosphorylation de la sérine 1459	
Kinase	PKC- α	Domaines 1-4 et H2-24 (pour FilamineA/C)	Phosphoryle le domaine 15 de la FilamineA	(Tigges, Koch et al. 2003)
	PTP-PEST	?	Contrôle la cytokinèse	(Playford, Lyons et al. 2006)
Kinase	p56lck	?	Phosphoryle Tyr un residue tyrosine du domaine 20	
Kinase	CaM kinaseII	ggFLN (Gallus gallus)	Phosphoryle et dissocie la FilamineA de l'actine F	
	μ -Calpaine	Domaines 23 pour FilamineA/B et domaine 24 pour FilamineC	Cleave H-1 et H-2	
	Furine	Domaines 13-24	FilamineA est nécessaire pour le transport de la Furine	
	Caspase	?	Clive la FilamineA	
	GranzymeB	?	Clive la FilamineA indépendamment de l'activation des Caspases	
	CFTR (« cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »)	9,12,17, 19, 21, 23	FilamineA est requise pour la stabilité et le transport de CFTR	(Playford, Nurminen et al. 2010)
	Récepteurs aux androgènes	18-19 (A) et la FilamineC	Les domaines 16 à 24 de la FilamineA sont clivés et co-transloqués dans le noyau avec le récepteur aux androgènes pour bloquer sa transactivation	(Ozanne, Brady et al. 2000)
	FOXC1	4-9, 16-21	L'interaction avec FOXC1 sur l'hétérochromatine condense du noyau inhibe sa transactivation	
	FEBP2 β /CBF β	H2-24	FilamineA retient PEBP2 β dans le cytoplasme et l'empêche d'agir avec le facteur de transcription Runx1 dans le noyau	(Yoshida, Ogata et al. 2005)
	Smad1~6	20-23 (FilamineA/B)	FilamineA facilite la phosphorylation et le transport nucléaire TGF β -dépendant de SMAD	(Sasaki, Masuda et al. 2001)
	BRCA1,2	21-24	Son interaction avec la FilamineA est nécessaire pour les étapes précoces de réparation de l'ADN	(Velkova, Carvalho et al. 2010)

	Récepteur à la dopamine D2, 3	19	Son interaction avec la FilamineA est nécessaire pour l'envoi et/ou la stabilisation du récepteur à la membrane plasmique	(Lin, Karpa et al. 2001)
	Récepteur senseur de Ca ²⁺	14-16	FilamineA empêche la dégradation du récepteur et induit sa localisation à la membrane plasmique, ce qui facilite la cascade de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases)	(Zhang and Breitwieser 2005)
	Caveoline-1	22-24	L'interaction avec la Caveoline-1 induit son endocytose Caveoline-dépendante	(Stahlhut and van Deurs 2000)
	Presenilines	21-24	FilamineA interagit avec la partie mutée des Presenilines dans les syndromes d'Alzheimer's familial	(Zhang, Han et al. 1998)
	ASB2 (« ankyrin repeat containing protein »)	? (avec FilamineA/B)	Cible les FilamineA et B pour la dégradation protéasomale	(Heuze, Lamsoul et al. 2008)
	FilamineB	24 et 16-23		(Sheen, Feng et al. 2002)

Inventaire non-exhaustif des protéines identifiées comme interagissant avec les Filamines. La fonction des protéines, le domaine d'interaction et la référence sont regroupés dans ce tableau.
D'après (Zhou, Boren et al. 2007; Nakamura, Stossel et al. 2011).

REFERENCES

Références

- Acloque, H., M. S. Adams, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." *J Clin Invest* **119**(6): 1438-1449.
- Aguirre, A. and V. Gallo (2004). "Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone." *J Neurosci* **24**(46): 10530-10541.
- Alberts, B., J. H. Wilson, et al. (2008). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
- Alvarez-Buylla, A. and J. M. Garcia-Verdugo (2002). "Neurogenesis in adult subventricular zone." *J Neurosci* **22**(3): 629-634.
- Ayala, R., T. Shu, et al. (2007). "Trekking across the brain: the journey of neuronal migration." *Cell* **128**(1): 29-43.
- Bakin, A. V., A. Safina, et al. (2004). "A critical role of tropomyosins in TGF-beta regulation of the actin cytoskeleton and cell motility in epithelial cells." *Mol Biol Cell* **15**(10): 4682-4694.
- Baldassarre, M., Z. Razinia, et al. (2009). "Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration." *PLoS One* **4**(11): e7830.
- Balenci, L., Y. Saoudi, et al. (2007). "IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro." *J Neurosci* **27**(17): 4716-4724.
- Bellanger, J. M., C. Astier, et al. (2000). "The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin." *Nat Cell Biol* **2**(12): 888-892.
- Bellion, A., J. P. Baudoin, et al. (2005). "Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear." *J Neurosci* **25**(24): 5691-5699.
- Borm, B., R. P. Requardt, et al. (2005). "Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization." *Exp Cell Res* **302**(1): 83-95.
- Broers, J. L., E. A. Peeters, et al. (2004). "Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies." *Hum Mol Genet* **13**(21): 2567-2580.
- Burrige, K. and K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." *Cell* **116**(2): 167-179.
- Busino, L., M. Donzelli, et al. (2003). "Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage." *Nature* **426**(6962): 87-91.
- Calderwood, D. A., A. Huttenlocher, et al. (2001). "Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration." *Nat Cell Biol* **3**(12): 1060-1068.
- Cano, A., M. A. Perez-Moreno, et al. (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." *Nat Cell Biol* **2**(2): 76-83.
- Cassidy, R. and J. Frisen (2001). "Neurobiology. Stem cells on the brain." *Nature* **412**(6848): 690-691.
- Chancellor, T. J., J. Lee, et al. (2010). "Actomyosin tension exerted on the nucleus through nesprin-1 connections influences endothelial cell adhesion, migration, and cyclic strain-induced reorientation." *Biophys J* **99**(1): 115-123.
- Chhabra, E. S. and H. N. Higgs (2007). "The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures." *Nat Cell Biol* **9**(10): 1110-1121.
- Chiasson, B. J., V. Tropepe, et al. (1999). "Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics." *J Neurosci* **19**(11): 4462-4471.
- Chojnacki, A. and S. Weiss (2008). "Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells." *Nat Protoc* **3**(6): 935-940.
- Chojnacki, A. K., G. K. Mak, et al. (2009). "Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?" *Nat Rev Neurosci* **10**(2): 153-163.

- Cicchini, C., I. Laudadio, et al. (2008). "TGFbeta-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling." *Exp Cell Res* **314**(1): 143-152.
- Clark, A. R., G. M. Sawyer, et al. (2009). "Skeletal dysplasias due to filamin A mutations result from a gain-of-function mechanism distinct from allelic neurological disorders." *Hum Mol Genet* **18**(24): 4791-4800.
- Coffinier, C., L. G. Fong, et al. (2010). "LINCing lamin B2 to neuronal migration: growing evidence for cell-specific roles of B-type lamins." *Nucleus* **1**(5): 407-411.
- Coskun, V., H. Wu, et al. (2008). "CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(3): 1026-1031.
- Crisp, M., Q. Liu, et al. (2006). "Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex." *J Cell Biol* **172**(1): 41-53.
- Cunningham, C. C., J. B. Gorlin, et al. (1992). "Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion." *Science* **255**(5042): 325-327.
- D'Addario, M., P. D. Arora, et al. (2001). "Cytoprotection against mechanical forces delivered through beta 1 integrins requires induction of filamin A." *J Biol Chem* **276**(34): 31969-31977.
- Dahl, K. N., A. J. Ribeiro, et al. (2008). "Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction." *Circ Res* **102**(11): 1307-1318.
- de Castro, F. and A. Bribian (2005). "The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development." *Brain Res Brain Res Rev* **49**(2): 227-241.
- De Sandre-Giovannoli, A., R. Bernard, et al. (2003). "Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria." *Science* **300**(5628): 2055.
- de Wit, M. C., I. F. de Co, et al. (2010). "Combined cardiological and neurological abnormalities due to filamin A gene mutation." *Clin Res Cardiol*.
- Delorme, V., M. Machacek, et al. (2007). "Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks." *Dev Cell* **13**(5): 646-662.
- Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* **425**(6958): 577-584.
- Doetsch, F. (2003). "The glial identity of neural stem cells." *Nat Neurosci* **6**(11): 1127-1134.
- Dromard, C., S. Bartolami, et al. (2007). "NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells." *Stem Cells* **25**(2): 340-353.
- Dyson, J. M., C. J. O'Malley, et al. (2001). "The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP-2, binds filamin and regulates submembraneous actin." *J Cell Biol* **155**(6): 1065-1079.
- Edlund, S., M. Landstrom, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA." *Mol Biol Cell* **13**(3): 902-914.
- Eksioglu, Y. Z., I. E. Scheffer, et al. (1996). "Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development." *Neuron* **16**(1): 77-87.
- Eriksson, M., W. T. Brown, et al. (2003). "Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome." *Nature* **423**(6937): 293-298.
- Feng, S., X. Lu, et al. (2005). "Filamin A binding stabilizes nascent glycoprotein Ibalph trafficking and thereby enhances its surface expression." *J Biol Chem* **280**(8): 6709-6715.
- Feng, Y., M. H. Chen, et al. (2006). "Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(52): 19836-19841.
- Feng, Y. and C. A. Walsh (2004). "The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling." *Nat Cell Biol* **6**(11): 1034-1038.
- Ferland, R. J., L. F. Batiz, et al. (2009). "Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia." *Hum Mol Genet* **18**(3): 497-516.
- Fink, J. M., W. B. Dobyns, et al. (1997). "Identification of a duplication of Xq28 associated with bilateral periventricular nodular heterotopia." *Am J Hum Genet* **61**(2): 379-387.
- Fletcher, D. A. and R. D. Mullins (2010). "Cell mechanics and the cytoskeleton." *Nature* **463**(7280): 485-492.

- Fox, J. W., E. D. Lamperti, et al. (1998). "Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia." *Neuron* **21**(6): 1315-1325.
- Fox, J. W. and C. A. Walsh (1999). "Periventricular heterotopia and the genetics of neuronal migration in the cerebral cortex." *Am J Hum Genet* **65**(1): 19-24.
- Franco, S. J. and A. Huttenlocher (2005). "Regulating cell migration: calpains make the cut." *J Cell Sci* **118**(Pt 17): 3829-3838.
- Franklin, R. J. and C. Ffrench-Constant (2008). "Remyelination in the CNS: from biology to therapy." *Nat Rev Neurosci* **9**(11): 839-855.
- Friedl, P., K. Wolf, et al. (2011). "Nuclear mechanics during cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **23**(1): 55-64.
- Fuchs, S. Y., V. S. Spiegelman, et al. (2004). "The many faces of beta-TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer." *Oncogene* **23**(11): 2028-2036.
- Gal, A., T. Sjoblom, et al. (2008). "Sustained TGF beta exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis." *Oncogene* **27**(9): 1218-1230.
- Gardel, M. L., F. Nakamura, et al. (2006). "Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1762-1767.
- Gates, J. and M. Peifer (2005). "Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions." *Cell* **123**(5): 769-772.
- Gay, O., B. Gilquin, et al. (2011). "RefilinB (FAM101B) targets FilaminA to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, et al. (2002). "Functional plasticity of CH domains." *FEBS Lett* **513**(1): 98-106.
- Glogauer, M., P. Arora, et al. (1998). "The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection." *J Biol Chem* **273**(3): 1689-1698.
- Gomes, E. R., S. Jani, et al. (2005). "Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells." *Cell* **121**(3): 451-463.
- Gorlin, J. B., R. Yamin, et al. (1990). "Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring." *J Cell Biol* **111**(3): 1089-1105.
- Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(10): 777-788.
- Grady, R. M., D. A. Starr, et al. (2005). "Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4359-4364.
- Gros-Louis, F., N. Dupre, et al. (2007). "Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia." *Nat Genet* **39**(1): 80-85.
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, et al. (2005). "The nuclear lamina comes of age." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 21-31.
- Hale, C. M., A. L. Shrestha, et al. (2008). "Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models." *Biophys J* **95**(11): 5462-5475.
- Haque, F., D. J. Lloyd, et al. (2006). "SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton." *Mol Cell Biol* **26**(10): 3738-3751.
- Hart, A. W., J. E. Morgan, et al. (2006). "Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin A." *Hum Mol Genet* **15**(16): 2457-2467.
- Hartwig, J. H. (1995). "Actin-binding proteins. 1: Spectrin super family." *Protein Profile* **2**(7): 703-800.
- Hartwig, J. H. and T. P. Stossel (1975). "Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages." *J Biol Chem* **250**(14): 5696-5705.
- Hay, E. D. (1995). "An overview of epithelio-mesenchymal transformation." *Acta Anat (Basel)* **154**(1): 8-20.
- Hay, E. D. (2005). "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." *Dev Dyn* **233**(3): 706-720.
- Heath, J. P. and B. F. Holifield (1993). "On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organisation of fibroblasts." *Symp Soc Exp Biol* **47**: 35-56.

- Heikkinen, O. K., S. Ruskamo, et al. (2009). "Atomic structures of two novel immunoglobulin-like domain pairs in the actin cross-linking protein filamin." *J Biol Chem* **284**(37): 25450-25458.
- Heuze, M. L., I. Lamsoul, et al. (2008). "ASB2 targets filamins A and B to proteasomal degradation." *Blood* **112**(13): 5130-5140.
- Hill, J. J., T. L. Tremblay, et al. (2009). "Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (TGF)-beta induced epithelial to mesenchymal transition." *Proteome Sci* **7**: 2.
- Himmel, M., P. F. Van Der Ven, et al. (2003). "The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins." *Biochemistry* **42**(2): 430-439.
- Hirano, M., T. Murata, et al. (2005). "cfm is a novel gene uniquely expressed in developing forebrain and midbrain, but its null mutant exhibits no obvious phenotype." *Gene Expr Patterns* **5**(3): 439-444.
- Hotulainen, P. and P. Lappalainen (2006). "Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells." *J Cell Biol* **173**(3): 383-394.
- Houben, F., F. C. Ramaekers, et al. (2007). "Role of nuclear lamina-cytoskeleton interactions in the maintenance of cellular strength." *Biochim Biophys Acta* **1773**(5): 675-686.
- Huttenlocher, A., S. P. Palecek, et al. (1997). "Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain." *J Biol Chem* **272**(52): 32719-32722.
- Ithychanda, S. S., M. Das, et al. (2009). "Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation." *J Biol Chem* **284**(7): 4713-4722.
- Ithychanda, S. S., D. Hsu, et al. (2009). "Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk." *J Biol Chem* **284**(50): 35113-35121.
- Ivanov, A. I., M. Bachar, et al. (2007). "A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions." *PLoS One* **2**(7): e658.
- Jay, D., E. J. Garcia, et al. (2004). "In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin." *Mol Cell Biochem* **260**(1-2): 49-53.
- Jockusch, B. M., P. Bubeck, et al. (1995). "The molecular architecture of focal adhesions." *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 379-416.
- Johansen, L. D., T. Naumanen, et al. (2008). "IKAP localizes to membrane ruffles with filamin A and regulates actin cytoskeleton organization and cell migration." *J Cell Sci* **121**(Pt 6): 854-864.
- Johansson, C. B., S. Momma, et al. (1999). "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system." *Cell* **96**(1): 25-34.
- Katoh, K., Y. Kano, et al. (2001). "Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers." *J Cell Biol* **153**(3): 569-584.
- Kesner, B. A., S. L. Milgram, et al. (2010). "Isoform divergence of the filamin family of proteins." *Mol Biol Evol* **27**(2): 283-295.
- Kessaris, N., M. Fogarty, et al. (2006). "Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage." *Nat Neurosci* **9**(2): 173-179.
- Khatau, S. B., C. M. Hale, et al. (2009). "A perinuclear actin cap regulates nuclear shape." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(45): 19017-19022.
- Khatau, S. B., D. H. Kim, et al. (2010). "The perinuclear actin cap in health and disease." *Nucleus* **1**(4): 337-342.
- Kiema, T., Y. Lad, et al. (2006). "The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin." *Mol Cell* **21**(3): 337-347.
- Kihara (2011). "physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap."
- Kihara, T., S. M. Haghparast, et al. (2011). "Physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap." *Biochem Biophys Res Commun*.
- Kim, H. and C. A. McCulloch (2010). "Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion." *FEBS Lett*.
- Kim, H., F. Nakamura, et al. (2010). "Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading." *Am J Physiol Cell Physiol* **298**(2): C221-236.

- Kirby, B. B., N. Takada, et al. (2006). "In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development." *Nat Neurosci* **9**(12): 1506-1511.
- Klaile, E., M. M. Muller, et al. (2005). "CEACAM1 functionally interacts with filamin A and exerts a dual role in the regulation of cell migration." *J Cell Sci* **118**(Pt 23): 5513-5524.
- Kondo, T. and M. Raff (2000). "Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells." *Science* **289**(5485): 1754-1757.
- Kondo, T. and M. Raff (2004). "Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells." *Genes Dev* **18**(23): 2963-2972.
- Kyndt, F., J. P. Gueffet, et al. (2007). "Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy." *Circulation* **115**(1): 40-49.
- Lad, Y., P. Jiang, et al. (2008). "Structural basis of the migfilin-filamin interaction and competition with integrin beta tails." *J Biol Chem* **283**(50): 35154-35163.
- Lad, Y., T. Kiema, et al. (2007). "Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding." *EMBO J* **26**(17): 3993-4004.
- Lammerding, J., L. G. Fong, et al. (2006). "Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics." *J Biol Chem* **281**(35): 25768-25780.
- Lamouille, S. and R. Derynck (2007). "Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway." *J Cell Biol* **178**(3): 437-451.
- Lasfar, A. and K. A. Cohen-Solal (2010). "Resistance to transforming growth factor beta-mediated tumor suppression in melanoma: are multiple mechanisms in place?" *Carcinogenesis* **31**(10): 1710-1717.
- Lassot, I., E. Segéral, et al. (2001). "ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase." *Mol Cell Biol* **21**(6): 2192-2202.
- Lee, J. S., C. M. Hale, et al. (2007). "Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration." *Biophys J* **93**(7): 2542-2552.
- Legate, K. R. and R. Fassler (2009). "Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 187-198.
- Lehembre, F., M. Yilmaz, et al. (2008). "NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin." *EMBO J* **27**(19): 2603-2615.
- Leung, T., X. Q. Chen, et al. (1996). "The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5313-5327.
- Li, R. and G. G. Gundersen (2008). "Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 860-873.
- Lin, R., K. Karpa, et al. (2001). "Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5258-5263.
- Liu, Y. and M. S. Rao (2004). "Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them." *Biol Cell* **96**(4): 279-290.
- Lowery, L. A. and D. Van Vactor (2009). "The trip of the tip: understanding the growth cone machinery." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 332-343.
- Lu, J., G. Lian, et al. (2007). "Filamin B mutations cause chondrocyte defects in skeletal development." *Hum Mol Genet* **16**(14): 1661-1675.
- Luxton, G. W., E. R. Gomes, et al. (2010). "Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement." *Science* **329**(5994): 956-959.
- Ma, X., S. Kawamoto, et al. (2004). "A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons." *Mol Biol Cell* **15**(6): 2568-2579.
- Maeda, M., K. R. Johnson, et al. (2005). "Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 873-887.
- Malatesta, P., I. Appolloni, et al. (2008). "Radial glia and neural stem cells." *Cell Tissue Res* **331**(1): 165-178.

- Mammoto, A., S. Huang, et al. (2007). "Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts." *J Cell Sci* **120**(Pt 3): 456-467.
- Maniotis, A. J., C. S. Chen, et al. (1997). "Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3): 849-854.
- Mantovani, F. and L. Banks (2003). "Regulation of the discs large tumor suppressor by a phosphorylation-dependent interaction with the beta-TrCP ubiquitin ligase receptor." *J Biol Chem* **278**(43): 42477-42486.
- Margottin-Goguet, F., J. Y. Hsu, et al. (2003). "Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase." *Dev Cell* **4**(6): 813-826.
- Massague, J. (2000). "How cells read TGF-[beta] signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 169-178.
- Masszi, A., C. Di Ciano, et al. (2003). "Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition." *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(5): F911-924.
- Mathes, E., E. L. O'Dea, et al. (2008). "NF-kappaB dictates the degradation pathway of IkappaBalpha." *EMBO J* **27**(9): 1357-1367.
- Mathes, E., L. Wang, et al. (2010). "Flexible regions within I{kappa}B{alpha} create the ubiquitin-independent degradation signal." *J Biol Chem* **285**(43): 32927-32936.
- McCoy, A. J., P. Fucini, et al. (1999). "Structural basis for dimerization of the Dictyostelium gelation factor (ABP120) rod." *Nat Struct Biol* **6**(9): 836-841.
- Mejillano, M. R., S. Kojima, et al. (2004). "Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end." *Cell* **118**(3): 363-373.
- Mellad, J. A., D. T. Warren, et al. (2010). "Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol*.
- Mercado-Pimentel, M. E. and R. B. Runyan (2007). "Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart." *Cells Tissues Organs* **185**(1-3): 146-156.
- Miettinen, P. J., R. Ebner, et al. (1994). "TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors." *J Cell Biol* **127**(6 Pt 2): 2021-2036.
- Mokry, J., J. Karbanova, et al. (2008). "Phenotypic and morphological characterization of in vitro oligodendroglialogenesis." *Stem Cells Dev* **17**(2): 333-341.
- Morin, P. J. (1999). "beta-catenin signaling and cancer." *Bioessays* **21**(12): 1021-1030.
- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2008). "Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton." *FEBS Lett* **582**(14): 2051-2065.
- Nagano, T., S. Morikubo, et al. (2004). "Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration." *J Neurosci* **24**(43): 9648-9657.
- Nagano, T., T. Yoneda, et al. (2002). "Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone." *Nat Cell Biol* **4**(7): 495-501.
- Nakagawa, K., M. Sugahara, et al. (2010). "Filamin associates with stress signalling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK activation." *Biochem J* **427**(2): 237-245.
- Nakamura, F., J. H. Hartwig, et al. (2005). "Ca²⁺ and calmodulin regulate the binding of filamin A to actin filaments." *J Biol Chem* **280**(37): 32426-32433.
- Nakamura, F., O. Heikkinen, et al. (2009). "Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin A mutations." *PLoS One* **4**(3): e4928.
- Nakamura, F., E. Osborn, et al. (2002). "Comparison of filamin A-induced cross-linking and Arp2/3 complex-mediated branching on the mechanics of actin filaments." *J Biol Chem* **277**(11): 9148-9154.

- Nakamura, F., T. M. Osborn, et al. (2007). "Structural basis of filamin A functions." *J Cell Biol* **179**(5): 1011-1025.
- Nakamura, F., R. Pudas, et al. (2006). "The structure of the GPIIb-filamin A complex." *Blood* **107**(5): 1925-1932.
- Nakamura, F., T. P. Stossel, et al. (2011). "The filamins: Organizers of cell structure and function." *Cell Adh Migr* **5**(2).
- Naumanen, P., P. Lappalainen, et al. (2008). "Mechanisms of actin stress fibre assembly." *J Microsc* **231**(3): 446-454.
- Nemethova, M., S. Auinger, et al. (2008). "Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella." *J Cell Biol* **180**(6): 1233-1244.
- Nery, F. C., J. Zeng, et al. (2008). "TorsinA binds the KASH domain of nesprins and participates in linkage between nuclear envelope and cytoskeleton." *J Cell Sci* **121**(Pt 20): 3476-3486.
- Nieto, M. A., M. G. Sargent, et al. (1994). "Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene." *Science* **264**(5160): 835-839.
- Noinaj, N., M. Guillier, et al. "TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function." *Annual Review of Microbiology* **64**(1): 43-60.
- Norden, C., S. Young, et al. (2009). "Actomyosin is the main driver of interkinetic nuclear migration in the retina." *Cell* **138**(6): 1195-1208.
- Norris, R. A., R. Moreno-Rodriguez, et al. (2010). "Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-A, during heart morphogenesis." *Dev Dyn* **239**(7): 2118-2127.
- Nurnberg, A., T. Kitzing, et al. (2011). "Nucleating actin for invasion." *Nat Rev Cancer* **11**(3): 177-187.
- Ohta, Y., J. H. Hartwig, et al. (2006). "FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling." *Nat Cell Biol* **8**(8): 803-814.
- Ohta, Y., N. Suzuki, et al. (1999). "The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2122-2128.
- Ostlund, C., E. S. Folker, et al. (2009). "Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins." *J Cell Sci* **122**(Pt 22): 4099-4108.
- Ozanne, D. M., M. E. Brady, et al. (2000). "Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin." *Mol Endocrinol* **14**(10): 1618-1626.
- Ozdamar, B., R. Bose, et al. (2005). "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity." *Science* **307**(5715): 1603-1609.
- Padmakumar, V. C., T. Libotte, et al. (2005). "The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope." *J Cell Sci* **118**(Pt 15): 3419-3430.
- Pak, C. W., K. C. Flynn, et al. (2008). "Actin-binding proteins take the reins in growth cones." *Nat Rev Neurosci* **9**(2): 136-147.
- Palmer, T. D., E. A. Markakis, et al. (1999). "Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS." *J Neurosci* **19**(19): 8487-8497.
- Parrini, E., A. Ramazzotti, et al. (2006). "Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations." *Brain* **129**(Pt 7): 1892-1906.
- Pellegrin, S. and H. Mellor (2005). "The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2." *Curr Biol* **15**(2): 129-133.
- Pellegrin, S. and H. Mellor (2007). "Actin stress fibres." *J Cell Sci* **120**(Pt 20): 3491-3499.
- Pentikainen, U. and J. Ylanne (2009). "The regulation mechanism for the auto-inhibition of binding of human filamin A to integrin." *J Mol Biol* **393**(3): 644-657.
- Peterson, L. J., Z. Rajfur, et al. (2004). "Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo." *Mol Biol Cell* **15**(7): 3497-3508.
- Pfaff, M., S. Liu, et al. (1998). "Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins." *J Biol Chem* **273**(11): 6104-6109.
- Piek, E., A. Moustakas, et al. (1999). "TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells." *J Cell Sci* **112** (Pt 24): 4557-4568.

- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.
- Playford, M. P., P. D. Lyons, et al. (2006). "Identification of a filamin docking site on PTP-PEST." *J Biol Chem* **281**(45): 34104-34112.
- Playford, M. P., E. Nurminen, et al. (2010). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with multiple Ig domains of filamin A." *J Biol Chem*.
- Pollard, T. D. (2007). "Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**: 451-477.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* **112**(4): 453-465.
- Popowicz, G. M., M. Schleicher, et al. (2006). "Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton." *Trends Biochem Sci* **31**(7): 411-419.
- Price, M. G., D. R. Caprette, et al. (1994). "Different temporal patterns of expression result in the same type, amount, and distribution of filamin (ABP) in cardiac and skeletal myofibrils." *Cell Motil Cytoskeleton* **27**(3): 248-261.
- Pudas, R., T. R. Kiema, et al. (2005). "Structural basis for vertebrate filamin dimerization." *Structure* **13**(1): 111-119.
- Razafsky, D. and D. Hodzic (2009). "Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections." *J Cell Biol* **186**(4): 461-472.
- Rechsteiner, M. and S. W. Rogers (1996). "PEST sequences and regulation by proteolysis." *Trends Biochem Sci* **21**(7): 267-271.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* **255**(5052): 1707-1710.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**(5651): 1704-1709.
- Robertson, S. P. (2005). "Filamin A: phenotypic diversity." *Curr Opin Genet Dev* **15**(3): 301-307.
- Robertson, S. P., S. R. Twigg, et al. (2003). "Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans." *Nat Genet* **33**(4): 487-491.
- Rogers, S., R. Wells, et al. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." *Science* **234**(4774): 364-368.
- Ronty, M., A. Taivainen, et al. (2004). "Molecular analysis of the interaction between palladin and alpha-actinin." *FEBS Lett* **566**(1-3): 30-34.
- Roux, K. J., M. L. Crisp, et al. (2009). "Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7): 2194-2199.
- Rowitch, D. H. and A. R. Kriegstein (2010). "Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification." *Nature* **468**(7321): 214-222.
- Sarkisian, M. R., C. M. Bartley, et al. (2006). "MEKK4 signaling regulates filamin expression and neuronal migration." *Neuron* **52**(5): 789-801.
- Sarkisian, M. R., C. M. Bartley, et al. (2008). "Trouble making the first move: interpreting arrested neuronal migration in the cerebral cortex." *Trends Neurosci* **31**(2): 54-61.
- Sasaki, A., Y. Masuda, et al. (2001). "Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling." *J Biol Chem* **276**(21): 17871-17877.
- Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." *Bioessays* **23**(10): 912-923.
- Savagner, P., B. Boyer, et al. (1994). "Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression." *Cancer Treat Res* **71**: 229-249.
- Schaar, B. T. and S. K. McConnell (2005). "Cytoskeletal coordination during neuronal migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(38): 13652-13657.
- Schenk, J., M. Wilsch-Brauninger, et al. (2009). "Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(38): 16487-16492.
- Schmoller, K. M., O. Lieleg, et al. (2009). "Structural and viscoelastic properties of actin/filamin networks: cross-linked versus bundled networks." *Biophys J* **97**(1): 83-89.

- Schneider, M., A. A. Noegel, et al. (2008). "KASH-domain proteins and the cytoskeletal landscapes of the nuclear envelope." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 6): 1368-1372.
- Scott, M. G., V. Pierotti, et al. (2006). "Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins." *Mol Cell Biol* **26**(9): 3432-3445.
- Seo (2008). "Crystal structure of the dimerization domain of human filamin A."
- Sheen, V. L., P. H. Dixon, et al. (2001). "Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females." *Hum Mol Genet* **10**(17): 1775-1783.
- Sheen, V. L., Y. Feng, et al. (2002). "Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact." *Hum Mol Genet* **11**(23): 2845-2854.
- Sheen, V. L., A. Jansen, et al. (2005). "Filamin A mutations cause periventricular heterotopia with Ehlers-Danlos syndrome." *Neurology* **64**(2): 254-262.
- Shook, D. and R. Keller (2003). "Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development." *Mech Dev* **120**(11): 1351-1383.
- Siripala, A. D. and M. D. Welch (2007). "SnapShot: actin regulators I." *Cell* **128**(3): 626.
- Siripala, A. D. and M. D. Welch (2007). "SnapShot: actin regulators II." *Cell* **128**(5): 1014.
- Small, J. V. (1994). "Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility." *Semin Cell Biol* **5**(3): 157-163.
- Small, J. V. (2010). "Dicing with dogma: de-branching the lamellipodium." *Trends Cell Biol.*
- Small, J. V. and G. P. Resch (2005). "The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility." *Curr Opin Cell Biol* **17**(5): 517-523.
- Small, J. V., T. Stradal, et al. (2002). "The lamellipodium: where motility begins." *Trends Cell Biol* **12**(3): 112-120.
- Solecki, D. J., N. Trivedi, et al. (2009). "Myosin II motors and F-actin dynamics drive the coordinated movement of the centrosome and soma during CNS glial-guided neuronal migration." *Neuron* **63**(1): 63-80.
- Sonnenberg, A. and R. K. Liem (2007). "Plakins in development and disease." *Exp Cell Res* **313**(10): 2189-2203.
- Spassky, N., F. T. Merkle, et al. (2005). "Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis." *J Neurosci* **25**(1): 10-18.
- Spencer, E., J. Jiang, et al. (1999). "Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP." *Genes Dev* **13**(3): 284-294.
- Stahlhut, M. and B. van Deurs (2000). "Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton." *Mol Biol Cell* **11**(1): 325-337.
- Starr, D. A. (2007). "Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus." *Mol Biosyst* **3**(9): 583-589.
- Starr, D. A. (2009). "A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes." *J Cell Sci* **122**(Pt 5): 577-586.
- Stossel, T. P., J. Condeelis, et al. (2001). "Filamins as integrators of cell mechanics and signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 138-145.
- Su, Y., C. Fu, et al. (2008). "APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase." *Mol Cell* **32**(5): 652-661.
- Suzuki, H., T. Chiba, et al. (2000). "Homodimer of two F-box proteins betaTrCP1 or betaTrCP2 binds to IkappaBalpha for signal-dependent ubiquitination." *J Biol Chem* **275**(4): 2877-2884.
- Suzuki, T., N. Osumi, et al. (2010). "Stabilization of ATF4 protein is required for the regulation of epithelial-mesenchymal transition of the avian neural crest." *Dev Biol* **344**(2): 658-668.
- Svitkina, T. M., E. A. Bulanova, et al. (2003). "Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network." *J Cell Biol* **160**(3): 409-421.
- Tadokoro, S., S. J. Shattil, et al. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." *Science* **302**(5642): 103-106.
- Takafuta, T., M. Saeki, et al. (2003). "A new member of the LIM protein family binds to filamin B and localizes at stress fibers." *J Biol Chem* **278**(14): 12175-12181.

- Takala, H., E. Nurminen, et al. (2008). "Beta2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding." *Blood* **112**(5): 1853-1862.
- Tanaka, T., F. F. Serneo, et al. (2004). "Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration." *J Cell Biol* **165**(5): 709-721.
- Tang, D. G., Y. M. Tokumoto, et al. (2000). "Long-term culture of purified postnatal oligodendrocyte precursor cells. Evidence for an intrinsic maturation program that plays out over months." *J Cell Biol* **148**(5): 971-984.
- Taverna, E. and W. B. Huttner (2010). "Neural progenitor nuclei IN motion." *Neuron* **67**(6): 906-914.
- Thery, M., A. Pepin, et al. (2006). "Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment." *Cell Motil Cytoskeleton* **63**(6): 341-355.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(2): 131-142.
- Thompson, T. G., Y. M. Chan, et al. (2000). "Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein." *J Cell Biol* **148**(1): 115-126.
- Tigges, U., B. Koch, et al. (2003). "The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha." *J Biol Chem* **278**(26): 23561-23569.
- Tsai, J. W., K. H. Bremner, et al. (2007). "Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue." *Nat Neurosci* **10**(8): 970-979.
- Tsai, J. W., Y. Chen, et al. (2005). "LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages." *J Cell Biol* **170**(6): 935-945.
- Tsai, J. W., W. N. Lian, et al. (2010). "Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells." *Nat Neurosci* **13**(12): 1463-1471.
- Tseng, Y., K. M. An, et al. (2004). "The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks." *J Biol Chem* **279**(3): 1819-1826.
- Tu, Y., S. Wu, et al. (2003). "Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation." *Cell* **113**(1): 37-47.
- Tullio, A. N., P. C. Bridgman, et al. (2001). "Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain." *J Comp Neurol* **433**(1): 62-74.
- Ueda, K., Y. Ohta, et al. (2003). "The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(4): 886-890.
- Vadlamudi, R. K., F. Li, et al. (2002). "Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1." *Nat Cell Biol* **4**(9): 681-690.
- van der Flier, A., I. Kuikman, et al. (2002). "Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits." *J Cell Biol* **156**(2): 361-376.
- van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). "Structural and functional aspects of filamins." *Biochim Biophys Acta* **1538**(2-3): 99-117.
- Vardouli, L., A. Moustakas, et al. (2005). "LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta." *J Biol Chem* **280**(12): 11448-11457.
- Velkova, A., M. A. Carvalho, et al. (2010). "Identification of filamin A as a BRCA1-interacting protein required for efficient DNA repair." *Cell Cycle* **9**(7).
- Verkhovsky, A. B., T. M. Svitkina, et al. (1995). "Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles." *J Cell Biol* **131**(4): 989-1002.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, et al. (2009). "Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(11): 778-790.
- Vignjevic, D., S. Kojima, et al. (2006). "Role of fascin in filopodial protrusion." *J Cell Biol* **174**(6): 863-875.
- Vignjevic, D., D. Yazar, et al. (2003). "Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network." *J Cell Biol* **160**(6): 951-962.

- Vorgerd, M., P. F. van der Ven, et al. (2005). "A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy." Am J Hum Genet **77**(2): 297-304.
- Wachsstock, D. H., W. H. Schwartz, et al. (1993). "Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels." Biophys J **65**(1): 205-214.
- Wakamatsu, Y., D. Sakai, et al. (2011). "FilaminB is required for the directed localization of cell-cell adhesion molecules in embryonic epithelial development." Dev Dyn **240**(1): 149-161.
- Wang, K., J. F. Ash, et al. (1975). "Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(11): 4483-4486.
- Wang, K. and S. J. Singer (1977). "Interaction of filamin with f-actin in solution." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(5): 2021-2025.
- Washington, R. W. and D. A. Knecht (2008). "Actin binding domains direct actin-binding proteins to different cytoskeletal locations." BMC Cell Biol **9**: 10.
- Watanabe, N., P. Madaule, et al. (1997). "p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." EMBO J **16**(11): 3044-3056.
- Webb, D. J., J. T. Parsons, et al. (2002). "Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again." Nat Cell Biol **4**(4): E97-100.
- Wendt, M. K., T. M. Allington, et al. (2009). "Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta." Future Oncol **5**(8): 1145-1168.
- Wiche, G. (1998). "Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics." J Cell Sci **111** (Pt 17): 2477-2486.
- Wilhelmsen, K., S. H. Litjens, et al. (2005). "Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin." J Cell Biol **171**(5): 799-810.
- Wilson, K. L. (2000). "The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression." Trends Cell Biol **10**(4): 125-129.
- Winder, S. J. and K. R. Ayscough (2005). "Actin-binding proteins." J Cell Sci **118**(Pt 4): 651-654.
- Winston, J. T., P. Strack, et al. (1999). "The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro." Genes Dev **13**(3): 270-283.
- Wirtz, D. and S. B. Khatau (2010). "Protein filaments: Bundles from boundaries." Nat Mater **9**(10): 788-790.
- Woo, M. S., Y. Ohta, et al. (2004). "Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site." Mol Cell Biol **24**(7): 3025-3035.
- Worman, H. J. and G. Bonne (2007). "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases." Exp Cell Res **313**(10): 2121-2133.
- Worthylake, R. A., S. Lemoine, et al. (2001). "RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration." J Cell Biol **154**(1): 147-160.
- Xu, J., S. Lamouille, et al. (2009). "TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition." Cell Res **19**(2): 156-172.
- Yonemura, S., M. Itoh, et al. (1995). "Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells." J Cell Sci **108** (Pt 1): 127-142.
- Yook, J. I., X. Y. Li, et al. (2005). "Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail." J Biol Chem **280**(12): 11740-11748.
- Yoshida, N., T. Ogata, et al. (2005). "Filamin A-bound PEBP2beta/CBFbeta is retained in the cytoplasm and prevented from functioning as a partner of the Runx1 transcription factor." Mol Cell Biol **25**(3): 1003-1012.
- Zavadil, J. and E. P. Bottinger (2005). "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions." Oncogene **24**(37): 5764-5774.
- Zeisberg, M. and E. G. Neilson (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." The Journal of clinical investigation **119**(6): 1429.

- Zhang, J., M. Betson, et al. (2005). "Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations." *J Cell Sci* **118**(Pt 23): 5549-5562.
- Zhang, M. and G. E. Breitwieser (2005). "High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation." *J Biol Chem* **280**(12): 11140-11146.
- Zhang, Q., C. Bethmann, et al. (2007). "Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity." *Hum Mol Genet* **16**(23): 2816-2833.
- Zhang, Q., C. Ragnauth, et al. (2002). "The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to Drosophila melanogaster muscle protein MSP-300." *Genomics* **80**(5): 473-481.
- Zhang, W., S. W. Han, et al. (1998). "Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins." *J Neurosci* **18**(3): 914-922.
- Zhang, X., K. Lei, et al. (2009). "SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice." *Neuron* **64**(2): 173-187.
- Zhang, X., R. Xu, et al. (2007). "Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation." *Development* **134**(5): 901-908.
- Zhang, X. F., A. W. Schaefer, et al. (2003). "Rho-dependent contractile responses in the neuronal growth cone are independent of classical peripheral retrograde actin flow." *Neuron* **40**(5): 931-944.
- Zheng, B., M. Han, et al. (2009). "Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression." *FEBS J* **276**(10): 2669-2685.
- Zhong, Z., K. L. Wilson, et al. (2010). "Beyond lamins other structural components of the nucleoskeleton." *Methods Cell Biol* **98**: 97-119.
- Zhou, A. X., J. H. Hartwig, et al. (2009). "Filamins in cell signaling, transcription and organ development." *Trends Cell Biol*.
- Zhou, B. P., J. Deng, et al. (2004). "Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition." *Nat Cell Biol* **6**(10): 931-940.
- Zhou, X., J. Boren, et al. (2007). "Filamins in cardiovascular development." *Trends Cardiovasc Med* **17**(7): 222-229.
- Zhou, X., F. Tian, et al. (2007). "Filamin B deficiency in mice results in skeletal malformations and impaired microvascular development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 3919-3924.

Résumé

Le cytosquelette d'actine est une structure dynamique capitale pour la cellule, qui intervient dans les processus de signalisation et génère des forces mécaniques pour compléter des fonctions aussi diverses que l'adhésion, la migration, la division ou la différenciation. Les protéines qui régulent cette structure sont capables de moduler ces fonctions. J'ai identifié une nouvelle famille de protéines régulatrices de l'actine, les protéines Refilines (RefilineA et RefilineB), dont l'expression est corrélée avec l'engagement des cellules dans des programmes de différenciation. La RefilineA est induite lors de la différenciation des cellules précurseurs neurales multipotentes en cellules progénitrices gliales. La RefilineB est stabilisée dans les cellules épithéliales lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induite par le TGF- β . Dans ces cellules, les Refilines agissent en se complexant à la FilamineA, une protéine qui se lie aux filaments d'actine et forme le maillage. Des syndromes génétiques de mutations sur le gène de la FilamineA entraînent d'importants défauts développementaux, cependant la fonction précise de la protéine reste à ce jour obscure.

Le complexe Refiline/FilamineA induit la formation de câbles d'actine et génère également une nouvelle structure d'actine périnucléaire appelée coiffe d'actine (« actin cap ») qui s'ancre à l'enveloppe nucléaire pour réguler les mouvements et la morphologie du noyau. Les Refilines sont les seules protéines identifiées à ce jour capables de catalyser la formation de structures périnucléaires d'actine. Ces résultats ouvrent donc de nouvelles perspectives pour appréhender les fonctions de la FilamineA ainsi que la biologie et les fonctions des structures périnucléaires d'actine.

Mots clés : Refiline, Filamine, progéniteurs neuraux, transition épithélio-mésenchymateuse, cfm.

Abstract

The actin cytoskeleton is a highly dynamic structure involved in cell signaling and that creates mechanical force for the completion of diverse functions such as adhesion, migration, division or differentiation. Proteins that regulate this structure can modulate its function. We identified a new protein family that regulates the actin cytoskeleton, Refilin proteins (RefilinA and RefilinB), and whose expression correlates with differentiation switches. RefilinA is induced during differentiation of neural multipotent precursors into glial progenitors, while RefilinB is stabilized in epithelial cells during epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β . In cells, Refilins interact with FilaminA, a protein that binds actin filaments to organize them into a network. Genetic syndromes where the FilaminA gene is mutated lead to important developmental defects,

The Refilin/FilaminA complex generates actin cables as well as a new perinuclear structure called « actin cap » that interacts with the nuclear envelope to regulate nuclear movement and shape. Refilin proteins are the only proteins identified so far that induce the formation of perinuclear actin structures. These results open up new perspective for the understanding of FilaminA's function as well as for the biology and functions of perinuclear actin structures.

Key words : Refilin, Filamin, neural progenitors, epithelial-mesenchymal transition, cfm.